

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V
ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



**Sekvenční analýza genomů viru KE, kmen
Hypr, v různých pasážích v hostiteli *in vivo*.**

Bakalářská práce

Zuzana Šimonová

Školitel: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

Školitel specialista: Mgr. Ján Štěrba

České Budějovice

2008

Šimonová Z., 2008: Sekvenční analýza genomů viru KE, kmen Hypr, v různých pasážích v hostiteli *in vivo*. [Complete genome sequence analysis of TBE virus, strain Hypr, in different passages in host *in vivo*. BSc. Thesis, in Czech] – 53p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

I have compared genomic sequences of three variants of tick-borne encephalitis virus, strain Hypr. The variants used were Hypr5 – virus passaged five times in suckling mice brains, Hypr50/V – a variant highly passaged *in vivo* in Vienna, and Hypr50/CB – a variant highly passaged *in vivo* in České Budějovice. Both high-passage variants were passaged in suckling mouse brains as well.

I was interested in changes in nucleotide sequence of genomes of high-passage variants Hypr50/V and Hypr50/CB compared with Hypr5 and also consequential changes in amino-acid sequences of viral proteins. I have found several identical changes in amino-acid sequences of E protein, NS3 and NS5 proteins in both high-passage variants and also a number of substitutions unique to one of the variants in proteins E, NS1, NS2A, NS2B, and NS3. A nucleotide substitution was found also in 3'UTR of the viral genome.

Projekt byl finančně podporován Výzkumným záměrem MSM 6007665801, grantem Grantové agentury ČR 524/06/1479 (řešitel L. Grubhoffer), výzkumným centrem LC 06009 MŠMT ČR (řešitel L. Grubhoffer) a grantem Grantové agentury Jihočeské univerzity 04-GAJU-45 (řešitel J. Štěrba).

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury a rad školitelů.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 30.4.2008

.....
Zuzana Šimonová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi, CSc., že mi umožnil pracovat na tak zajímavém tématu jako je klíš'ová encefalitida, byl vždy laskavý a pozorný. Můj vřelý dík patří také mému školiteli – specialistovi Mgr. Janku Štěrbovi za jeho přátelské chování, za cenné rady a zkušenosti a také za čas, který mi navzdory svému vytížení obětoval. Za příjemnou atmosféru a přátelské prostředí děkuji celému kolektivu laboratoře.

Velký vděk patří mým rodičům za to, že mě ke studiu vždy vedli a pomáhali mi, také přátelům a blízkým za psychickou podporu. Nejvíce jsem však vděčná svému manželovi Davidovi, který při mně za každé situace stál a stojí.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Hlavní cíle práce	2
2. Literární přehled	3
2.1 Virus klíšťové encefalitidy	3
2.1.1 Historie	3
2.1.2 Epidemiologie	3
2.1.3 Patogeneze klíšťové encefalitidy	5
2.1.4 Molekulárně-biologická charakteristika viru	6
2.1.5. Replikační cyklus	12
2.1.6. Pasážování	14
3. Materiál a metody	16
3.1 Materiál	16
3.1.1 Virus	16
3.2. Metody	16
3.2.1. Izolace RNA	16
3.2.2 Reverzní transkripce	16
3.2.3. PCR	17
3.2.4 Agarózová elektroforéza	17
3.2.5. Eluce z gelu	17
3.2.6. Sekvenční analýza	18
3.2.7. Predikce sekundární struktury RNA	18
3.2.8. 3D modely proteinu E	18
4. Výsledky	20
4.1. PCR varianty Hypr5	20
4.2. Kompletní genomová sekvenční analýza	20
4.3. 3D modely proteinu E	24
5. Diskuse	34
6. Závěr	37
7. Seznam zkratk	38
8. Přehled literatury	39
9. Příloha	46

1. Úvod:

Virus klíšťové encefalitidy patří mezi viry, které způsobují závažné infekční onemocnění. Jedná se o arbovirus, jehož životní cyklus zahrnuje přenašeče – klíště a savčí hostitele.

Sekvenční pasážování viru v klíštěcích popřípadě savčích buňkách má za následek adaptaci viru a selekci variant, které jsou lépe uzpůsobené replikaci v daném prostředí. Otázka, jak ovlivňuje pasážování vlastnosti viru, mě zaujala. Ve své práci se tedy věnuji porovnávání genomových sekvencí tří variant viru klíšťové encefalitidy, kmenu Hypr. Srovnávám původnější nízkopasážovanou variantu se dvěma variantami, které prodělaly vysoký počet pasáží v mozcích sajících myšek, pocházející ze dvou různých pracovišť.

Pomocí sekvenční analýzy jsem pozorovala změny, které v genomu obou variant mnohonásobným pasážováním nastaly.

1.1. Hlavní cíle práce:

- sekvenovat virus klíšťové encefalitidy, kmen Hypr, varianta Hypr5,
- sekvenovat virus KE, kmen Hypr, varianta Hypr50/CB,
- porovnat nukleotidovou sekvenci genomů obou studovaných variant,
- porovnat nukleotidovou sekvenci genomů obou studovaných variant s publikovanou sekvencí varianty Hypr50/V,
- porovnat aminokyselinové sekvence virových proteinů u všech tří variant.

2. Literární přehled

2.1. Virus klíšťové encefalitidy

Klíšťová encefalitida (KE) je velmi závažné infekční virové onemocnění napadající především mozek a mozkové blány. Patří k nejnebezpečnějším neuroinfekčním onemocněním v Evropě a Asii a je způsobena virem klíšťové encefalitidy (Gritsun *et al.*, 2003).

Virus klíšťové encefalitidy patří do čeledi Faviviridae a rodu Flavivirus (Heinz *et al.*, 2001). Flaviviry můžeme rozdělit do tří hlavních skupin, na viry přenášené komáry, viry přenášené klíšťaty a viry s dosud neznámým vektorem. První skupina zahrnuje významné druhy, k nimž patří virus Žluté zimnice, virus Dengue, virus Západního Nilu, virus Japonské encefalitidy. Nejvýznamnějším flavivirem přenášeným klíšťaty je virus klíšťové encefalitidy. Dále lze flaviviry rozdělit do dvou podskupin podle jejich hostitele – savčí podskupina (cílový hostitel je savec) a podskupina mořských ptáků (cílový hostitel je z řad mořských ptáků). Virus klíšťové encefalitidy patří do savčí podskupiny a zahrnuje tři subtypy:

- východní a sibiřský subtyp – přenášené především klíštětem *Ixodus persulcatus* a
- subtyp Západní Evropy, kde je vektorem klíště *Ixodes ricinus* (Gritsun *et al.*, 2003).

2.1.1. Historie

Jako první popsal onemocnění KE rakouský lékař Schneider v roce 1931. Charakterizoval skupinu případů aseptické meningoencefalitidy, které se objevily jen v určitých charakteristických ročních obdobích, sezónách (Schneider *et al.*, 1931).

Samotný virus KE objevil v roce 1937 sovětský vědec Zilber při svých cestách východním Ruskem. Prokázal, že tato nemoc je způsobená přenosem viru klíšťové encefalitidy na člověka pomocí klíštěte *I. persulcatus* (Zilber *et al.*, 1939).

Další sovětský vědec Pavlovsky pak v roce 1939 popsal přenos viru z klíštěte na savece (Pavlovsky *et al.*, 1947).

2.1.2. Epidemiologie

Onemocnění klíšťové encefalitidy se vyskytuje v řadě oblastí Evropy, převážně v Evropě východní a střední, dále také v Rusku a v Asii (Dumpis *et al.*, 1998). Výskyt nemoci je spojen hlavně s rozšířením klíšťat a proto je většina případů soustředěna do ohniskových oblastí, kde se infikovaná klíšťata v hojně míře vyskytují. Obecně lze říci, že počet případů dlouhodobě mírně

roste a plocha rizikových oblastí se pomalu rozšiřuje. V ČR představují nejvíce rizikovou oblast jižní Čechy a obecně okolí Vltavy a Berounky; kromě toho se za vysoce rizikové označují některé části Jeseníků a Českomoravské vrchoviny. V posledních letech bylo na území České republiky evidováno kolem 10 případů klíšťové encefalitidy na 100 000 obyvatel ročně. To řadí Českou republiku na druhé místo v Evropě i ve světě, překonává ji pouze Rusko (<http://www1.szu.cz/cem/epidat/epirel-97-06.htm>).

Hlavním hostitelem a rezervoárem viru jsou malí hlodavci. Přenašečem viru je klíště, přičemž virem KE se může infikovat několik druhů klíšťat, ale jen *I. persulcatus* a *I. ricinus* mohou přenést virus na člověka (Chunikhin, 1991). Člověk je pouze náhodným hostitelem; podobně jako větší zvířata (např. vysoká lesní zvěř) se nakazí náhodně a pravděpodobně hraje méně důležitou roli v přenosu viru v přírodě (Blaskovich, 1970). Kozy, ovce a krávy jakožto domestikovaná zvířata představují pro člověka nebezpečí infekce, protože infikovaná zvířata vylučují virus do mléka. Nejčastějším případem nákazy mlékem je konzumace nepasterizovaného koziho mléka (Vingre *et al.*, 1984). V roce 1951 byla ve slovenské Rožňavě popsána epidemie KE, kdy zemědělci přidávali infikované kozí mléko do kravského. Další případ byl zaznamenán např. v roce 1999 na Vsetínsku, kdy po konzumaci ovčího sýra onemocnělo 22 osob (Grešíková, 1999). Při perorální infekci, jakou je i požití infikovaného mléka, je inkubační doba prodloužená a to zmírňuje průběh infekce KE (Grešíková, 1999).

Virus může chronicky infikovat klíšťata v kterémkoli stádiu jejich vývoje (jež jsou larva, stadium nymfy, dospělý jedinec) při sání krve nakaženého zvířete (Chunikhin *et al.*, 1983). Nedávné případy ukázaly, že přenos viru KE z infikovaného klíštěte na neinfikované, sající na tom samém zvířeti, může nastat, i když u hostitele není rozvinutá nebo prokazatelná infekce; k přenosu viru dojde i v případě, že je hostitel k infekci KE imunní (Labuda *et al.*, 1993, 1997).

Množství klíšťat infikovaných KE je na různých územích odlišné. V některých oblastech Evropy se vyskytují infikovaná klíšťata v procentuálním zastoupení 0,5% až 5%. Avšak v určitých regionech Ruska bylo dokonce zjištěno až 40% promořenosti klíšťat virem KE (Smorodintsev, 1958).

Případy onemocnění lidí KE se objevují hlavně v období mezi dubnem a listopadem, kdy jsou klíšťata nejvíce aktivní. Každý druh klíštěte se liší obdobím svého nejvyššího výskytu. Klíště východního typu *I. persulcatus* se vyskytuje nejvíce na jaře, klíště západního typu *I. ricinus* zase především na začátku podzimu (Birulya a Zalutskaya, 1965).

Nejvyšší výskyt KE je na vesnicích a v přírodě, proto je také riziko nákazy při pobytu v těchto lokalitách větší. Střídavé cestování a stěhování obyvatel z měst na venkov a naopak, vede k přibývání případů s onemocněním KE.

Také globální oteplování způsobuje, že případů KE v tomto století stoupá. Teplejší počasí vede k rozšiřování populací hlodavců a přispívá také k větší aktivitě klíšťat. Současně se také rozšiřuje území, kde se klíšťata vyskytují (Birulya a Zalutskaya, 1965).

Jak je již zmíněno výše, podle místa výskytu dělíme virus KE na subtypy a to na Východní subtyp, Sibiřský subtyp viru a Západní subtyp. Podle subtypu viru KE se liší intenzita a projev onemocnění KE. Všeobecně platí, že virus Východního subtypu způsobuje těžší formu nemoci, přičemž záleží na věku nakaženého člověka.

Pro srovnání: onemocnění způsobené Východním subtypem viru KE probíhá podstatně hůře u dětí. Riziko postižení parézou a neúplnou obrnou je až 40% (Gustavson *et al.*, 1993; Kanter, 1965). I úmrtnost je znatelně vyšší, představuje rozmezí mezi 5% a 20% (Gustafson *et al.*, 1993). Naproti tomu Západní subtyp viru KE způsobuje těžší průběh u dospělých, hlavně jedinců starších 60 let (Haglund *et al.*, 1996). Riziko parézy je v porovnání s Východním subtypem nižší, kolem 10% a úmrtnost se pohybuje mezi 0,5% a 2% (Gustafson, 1993).

Pokud na člověku saje více infikovaných klíšťat zároveň, má předpoklad k těžšímu průběhu nemoci (Okulova *et al.*, 1989).

2.1.3. Patogeneze klíšťové encefalitidy

Člověk (všeobecně obratlovec) se může infikovat několika způsoby. Nejčastější způsob nákazy hostitele je případ, když se na jeho kůži přisaje infikované klíště. Druhý způsob je konzumace čerstvého, tepelně neupraveného mléka infikovaných zvířat, hlavně koz, jak je zmíněno výše. Další riziko nákazy představuje proniknutí viru přítomného v aerosolu do organismu čichovým epitelem (nebezpečí především při práci v laboratoři) (Avsic-Zupanc *et al.*, 1995).

Když se infikované klíště (vektor) přisaje na kůži hostitele, virus se uvolní pod kůži hostitele a replikuje se v buňkách kůže a podkožním vazivu. Infikované dendritické buňky kůže opouští epidermis a putují lymfatickým systémem do drenážních lymfatických uzlin, kde se virus dále množí. Odtamtud se virové partikule šíří krevním řečištěm do ostatních tkání těla a způsobují virémii. Ve viremickém stadiu napadá virus především retikulo-endoteliální systém (slezina, játra a kostní dřeň) a zároveň proniká do centrální nervové soustavy (CNS). V tomto

stadiu se projevují první příznaky onemocnění – bolení hlavy a svalů, horečka a únava (Málková a Kolman, 1964).

Další způsob nákazy představuje proniknutí viru do organismu čichovým nervem. Největší riziko představuje práce v laboratoři, kde je člověk infekčnímu aerosolu vystaven. Virus přítomný v aerosolu vniká do organismu přes epitel nosohltanu nebo může proniknout přímo do centrální nervové soustavy přes čichový nerv (Avsic-Zupanc *et al.*, 1995). Přístup viru do CNS přes čichový epitel a následná zánětlivá reakce může mít za následek u některých pacientů vážné trvalé následky až smrt.

U přirozených hostitelů virus nezpůsobuje symptomatické onemocnění, neuropatogenní je virus KE u obratlovců, především u člověka. Neuropatogeneze viru KE je ovlivněná dvěma jeho vlastnostmi – neuroinvasivitou a neurovirulencí. Neuroinvasivita popisuje schopnost viru proniknout do CNS. S tím je spojená jeho schopnost replikovat se a šířit se periferními tkáněmi a dosáhnout vysokého stupně virémie. Neurovirulence představuje schopnost způsobit encefalitidu a cytopatickou infekci v mozku (McMinn, 1997).

Pro invazi viru do CNS je nezbytný vysoký stupeň virémie. V CNS jsou primárním cílem neurony, přestože mohou být infikovány i ostatní buňky (Mandl *et al.*, 2005). Poškození CNS je rozsáhlé a zahrnuje hlavně šedou hmotu mozkovou, prodlouženou míchu, mozkový kmen i páteřní míchu (Bednář *et al.*, 1961, Fingerland *et al.*, 1961, Grinschgl *et al.* 1961).

2.1.4. Molekulárně-biologická charakteristika viru

Virion flavivirů má oválný tvar o průměru asi 50 nm. Nukleokapsidu viru KE tvoří jednořetězcová RNA pozitivní polarity, která je uzavřená do kapsidy tvořené proteinem C. Tato nukleokapsida je obalena membránou, odvozenou od hostitelské buňky, obsahující proteiny M (membrane) a E (envelope) (Gritsun, 1997).

RNA je dlouhá přibližně 11 000 nukleotidů a obsahuje jeden dlouhý čtecí rámeček, ORF (open reading frame), který kóduje asi 3 400 aminokyselin. Má pozitivní polaritu, díky čemuž může sloužit přímo jako mRNA. Na 5' a 3' koncích ORF se nacházejí netranslatovaná místa (NCRs – noncoding regions nebo také UTRs – untranslated regions). 3' konec NCR se u jednotlivých kmenů významně liší v délce, od 350 do 750 nukleotidů, a na rozdíl od jiných (+)RNA virů neobsahuje na svém 3' konci poly-A sekvence, nýbrž končí konzervovanými úseky vytvářejícími vlásenkovou strukturu (Wallner *et al.*, 1995).

5' netranslatovaný konec je dlouhý 95 – 132 nukleotidů a je bohatý na nukleotidy A a G. Nese metylguanidinovou čepičku (typu 1) a obsahuje dva konzervované úseky oddělené jedním

variabilním segmentem. 5' konec NCR je důležitý pro utváření vlásenkových struktur, které stejně jako u 3' NCR tvoří správnou strukturu a konformaci RNA pro replikaci, translaci a zabalení RNA do kapsidy (Raucher *et al.*, 1997).

Translací virové RNA se vytvoří dlouhý polyprotein, který je kotranslačně i posttranslačně štěpen virovou proteázou NS2B/NS3 a hostitelskými proteázami na 10 proteinů. Na N-konci jsou lokalizovány strukturální proteiny, nejprve protein C, prM/M a E, za nimi následují nestrukturní proteiny NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5 (Lindenbach a Rice, 2003).

Protein C (capsid):

Jako první se odštěpuje od nově vznikajícího polyproteinu protein C. Je to silně basický protein o velikosti přibližně 11 kDa (Boege *et al.*, 1983) a spolu s RNA vytváří nukleokapsidu. Oba konce tohoto proteinu jsou tvořeny kladně nabitými zbytky, které pravděpodobně zprostředkovávají interakci s RNA (Kofler *et al.*, 2002).

Studiem vlivu mutací v proteinu C bylo zjištěno, že časté delece na N-konci proteinu C snižují uvolňování kompletovaných virionů KE z buňky a zvyšují produkci RSP částic (popsány níže). Delece menší než šestnáct aminokyselin jsou však zanedbatelné a nemají vliv na množení viru (Kofler *et al.*, 2002). Struktura proteinu C nebyla dosud určena, z primární sekvence aminokyselin lze však předpokládat, že je bohatá na alfa helixy.

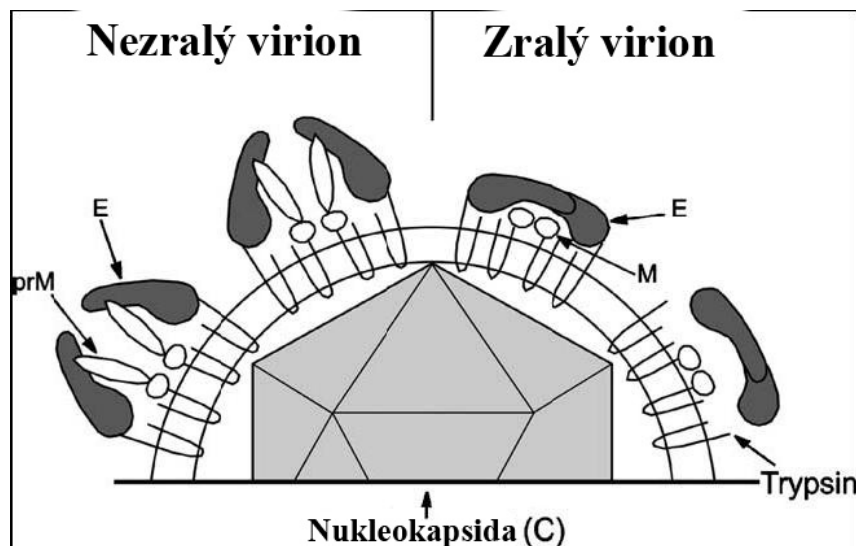
Protein M (membrane):

Je strukturální složkou zralých virionů. U nezralých najdeme prM, jeho prekurzor. prM má kolem 26 kDa a je translokován do ER díky hydrofóbní doméně na karboxylovém konci proteinu C, viz výše. Protein prM je od polyproteinu odštěpován virovou proteázou NS2B/NS3 (Lindenbach a Rice, 2003).

N-konec proteinu prM je *N*-glykosylovaný (Chambers *et al.*, 1990) a obsahuje šest konzervovaných cysteinových zbytků, všechny disulfidicky spojené (Nowak a Wrengler, 1987). Při zrání virionu dochází ke štěpení proteinu prM na protein M a malý protein pr. Toto štěpení probíhá v Golgiho aparátu za působení protézy furinu (Stadler *et al.*, 1997). Glykosylovaná pr část je uvolněna, zatímco protein M zůstává v membráně virionu.

prM má v nezralém virionu funkci chaperoninu, protože je potřebný ke správnému sbalení proteinu E (Lorenz *et al.*, 2002). Chrání protein E před nevratnými konformačními změnami během maturace, vedoucími ke vzniku nefunkčního virionu. V časně fázi sekreční

dráhy je totiž v sekrečních vácích nízké pH, které by za nepřítomnosti prM způsobilo změnu konformace proteinu E z dimeru na trimer (Guirakhoo *et al.*, 1991). Následně se virion dostává do endoplazmatického retikula, kde dochází k odštěpení pr od proteinu prM hostitelskou peptidázou a dochází ke správnému sbalení proteinu E (Gritsun *et al.*, 1995).



Obrázek 2.1: Schéma uspořádání zralého a nezralého virionu KE (Heinz, 2003).

Obalový protein E (envelope):

Protein E má velikost asi 53 kDa. Ve virionu se nachází v lipidové membráně a je N-glykosylovaný. Zdá se, že viriony klíšťové encefalitidy mají tento protein N-glykosylován v jediném místě (Winkler *et al.* 1987), i když se v jeho aminokyselinové sekvenci vyskytuje ještě další glykosylační místo.

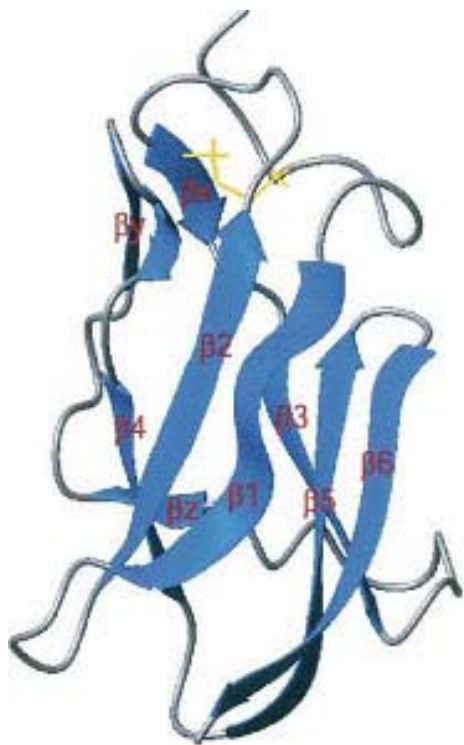
Protein E zprostředkovává specifickou vazbu k buněčnému receptoru a fúzi s buněčnou membránou, nese antigeny vyvolávající imunitní odpověď hostitele, díky čemu je lze využít k aktivní imunizaci. Ve zralém virionu se protein E nachází ve formě komplexu dvou monomerních podjednotek zakotvených svými distálními konci do membrány. Po endocytóze virionu do hostitelské buňky se ve vzniklém endozomu sníží pH, které způsobí ireverzibilní přeuspořádání E proteinu z dimerů do trimerů. Trimery E proteinu umožní splynutí virového obalu s membránou endozomu a iniciují tím infekci (Holzmann *et al.*, 1995).

3-D struktura proteinu E byla určena rentgenovou krystalografií (Rey *et al.*, 1995). Molekula proteinu E je tvořená třemi doménami.

Doména I tvoří centrální částí proteinu a má strukturu beta soudku (osm antiparalelních beta listů), obsahuje N-konec, dva disulfidické můstky a místo, kde je protein N-glykosylovaný

molekulou sacharidu. Některé studie tvrdí, že glykosylace nehraje důležitou roli ve funkci proteinu (Chambers *et al.*, 1990; Hurrelbrink a McMinn, 2003). Jiné studie naopak prokázaly, že tato glykosylace ovlivňuje sekreci RSP částic. Pokud je glykosylační místo mutováno, sníží se sekrece RSP částic (Lorenz *et al.*, 2002). Jestli má však tento postranní sacharidový řetězec vliv na maturaci viru zůstává nejasný (Chambers *et al.*, 1990). Doména I obsahuje 120 aminokyselinových zbytků, které můžeme rozdělit do tří částí (zbytky 1 – 51, 137 – 189 a 285 – 302). Mezi těmito částmi jsou dvě dlouhé smyčky – doména II (Rey *et al.*, 1995).

Doména II může být tedy považována za subdoménu domény I. Je tvořena dvěma dlouhými nespojitými smyčkami, které rozšiřují doménu I a vytváří strukturu podobnou prstu. Obsahuje také tzv. fúzní peptid umožňující fúzi membrán (viz níže) (Heinz a Allison, 2003). Doména II je tvořena převážně beta listy a jedna ze smyček je stabilizována třemi disulfidickými můstky. Doména II je pravděpodobně hlavní oblastí, která je zodpovědná za interakci monomerů v dimeru proteinu E (Mandl *et al.*, 2000).



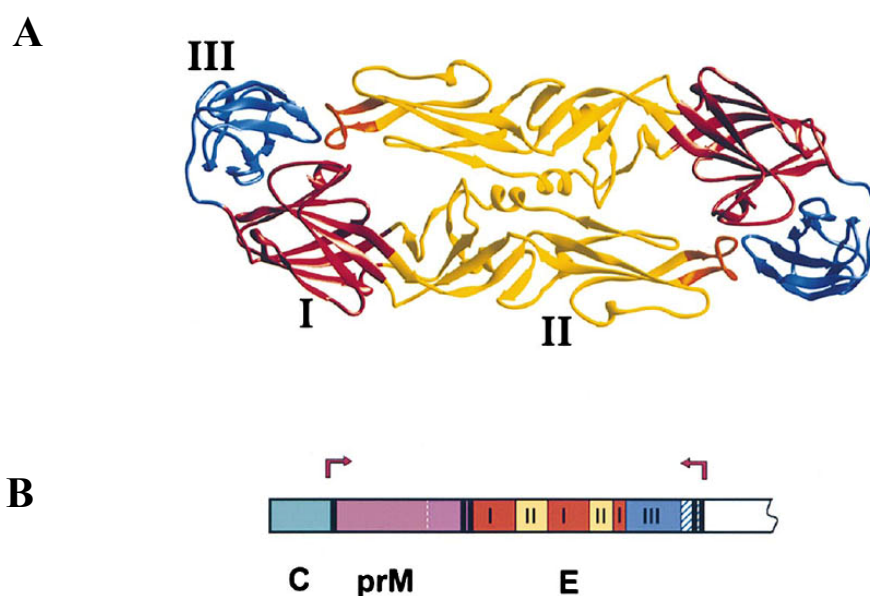
Obrázek 2.2: Doména III v proteinu E viru KE vlákna $\beta 1 - \beta 6$; upraveno, Mukherjee *et al.*, 2006.

Doména III obsahuje 100 aminokyselin (počet se liší v závislosti na druhu), má typický žlábek imunoglobulinové konstantní domény, který je kolmo vnořený do virové membrány. Tato Ig doména obsahuje disulfidický můstek a je spojena s doménou I úsekem 15ti aminokyselin. Doména III se nachází na povrchu virionu a pravděpodobně se také váže k buněčnému receptoru hostitelské buňky (Mandl *et al.*, 2000; Rey *et al.*, 1995). 3D struktura domény III se skládá z 6 antiparalelních β listů, které dohromady tvoří strukturu podobnou β soudku. Právě ten svým

uspořádáním připomíná konstantní doménu imunoglobulinu. V doméně III se mimo to nachází ještě 3 krátké β vlákna β_x , β_y a β_z (viz obrázek 2.2) (Zheng *et al.* 2004).

Dále jsou známy tři hlavní antigenní domény, které se označují jako A, B a C, přičemž doména A je lokalizována na strukturní doméně II, B na doméně III a C se nachází v rámci strukturní domény I (McMinn, 1997). Doména A nese epitopy podmiňující zkříženou reaktivitu mezi různými flaviviry, kdežto epitopy na dalších dvou doménách již odpovídají za typově a subtypově specifickou reaktivitu (Rey *et al.*, 1995).

Nízké pH způsobuje změnu konformace proteinu E, čímž dochází ke změně z horizontálního antiparalelního uspořádání dimeru na vertikální paralelně konformovaný trimer. Doména I, II a III zůstávají během této změny konformace zachovány (Stiasny *et al.*, 2004). Prostorové uspořádání E proteinu je stejné u všech flavivirů.



Obrázek 2.3: A – struktura proteinu E, domény I, II a III; B – N-konec genomu klíšťové encefalidity- strukturní proteiny (Reflenghi 2001)

Nestrukturní proteiny:

NS1 (s molekulární hmotností kolem 46 kDa) je glykoprotein asociovaný s buněčnou membránou. V polyproteinu je umístěn za proteinem E, společně se kterým je po translaci přemístěn do endoplasmatického retikula, kde je od proteinu E odštěpen hostitelskou signální peptidázou a následně glykosylován (Ryan *et al.*, 1998). NS1 se nachází ve formě dimerů uvnitř infikovaných buněk i na jejich povrchu. Ve formě pentameru či hexameru je také pomalu secernován z buněk (Crooks *et al.*, 1994); význam sekrece ale není znám.

Protein NS1 obsahuje u různých flavivirů dvě nebo tři N-glykosylovaná místa a 12 konzervovaných cysteinů, které tvoří disulfidické můstky. Vnášením bodových mutací se prokázalo, že glykosylace proteinu NS1 je nezbytná pro replikaci virové RNA. Mutace v prvním i druhém N-glykosylovaném místě vedly k dramatickým změnám v replikaci RNA a produkci viru (Muylaert *et al.*, 1996).

Při sekreci NS1 ven z buňky je nastartovaná silná humorální imunologická odpověď proti epitopům tohoto proteinu (Chang *et al.*, 2002). Protilátky navázané na povrch buňky mohou zapříčinit lýzu infikovaných buněk pomocí komplementu (Henchal *et al.*, 1988). Proto byly také secernované formy NS1 původně charakterizovány jako rozpustný antigen vázající komplement přítomný v séru a tkáních infikovaných zvířat (Brandt *et al.*, 1970).

NS2A je relativně malý (22 kDa), hydrofobní, transmembránový protein, který je součástí replikačního komplexu. Inhibuje indukci interferon, hraje roli při skládání virionu (Leung *et al.*, 2008).

Protein NS2B je malý (14 kDa) protein asociovaný s membránou, který vytváří komplex s proteinem NS3, pro jehož proteázovou aktivitu je nezbytným kofaktorem (Arias *et al.*, 1993).

NS3 je druhým největším (70 kDa) virovým proteinem. Tento multifunkční protein zprostředkovává důležité enzymatické aktivity, jako proteáza slouží N-koncová třetina NS3 proteinu (Bazan a Fletterick, 1989), karboxylový konec proteinu má RNA-trifosfátázovou aktivitu a také se účastní replikace RNA jako helikáza (Gorbalenya *et al.*, 1989). Díky interakci s proteinem NS2B je asociován s membránou (Chambers *et al.*, 1993).

Proteiny NS4A a NS4B jsou malé (16 a 27 kDa) a hydrofobní. Předpokládá se, že NS4A hraje roli při replikaci RNA (Lindenbach a Rice, 1999). C-konec proteinu NS4A slouží jako signální sekvence pro přesun proteinu NS4B do lumen endoplasmatického retikula. NS4B je transmembránový protein (Westaway *et al.*, 1997) a jeho funkce zatím není známa.

NS5 je největší (103 kDa), vysoce konzervovaný, multifunkční virový protein, který se účastní replikace RNA jako RNA-dependentní RNA polymeráza (Steffens *et al.*, 1999). Na N-konci (60 až 132 aminokyselin) byla nalezena homologie s enzymem metyltransferázou, který je zapojen do formování čepičky na 5'konci RNA (Koonin, 1993).

Struktura virionu a subvirových částic:

Viry jsou částice o velikosti několik desítek až stovek nm, v případě KE přibližně 50 nm, a proto jsou optickým mikroskopem nepozorovatelné. Pozorování struktury virů nám umožňují

elektronové mikroskopy. Transmisní elektronový mikroskop (TEM) odhaluje ultrastrukturu viru a skenovací elektronový mikroskop (SEM) zase povrch virových částic.

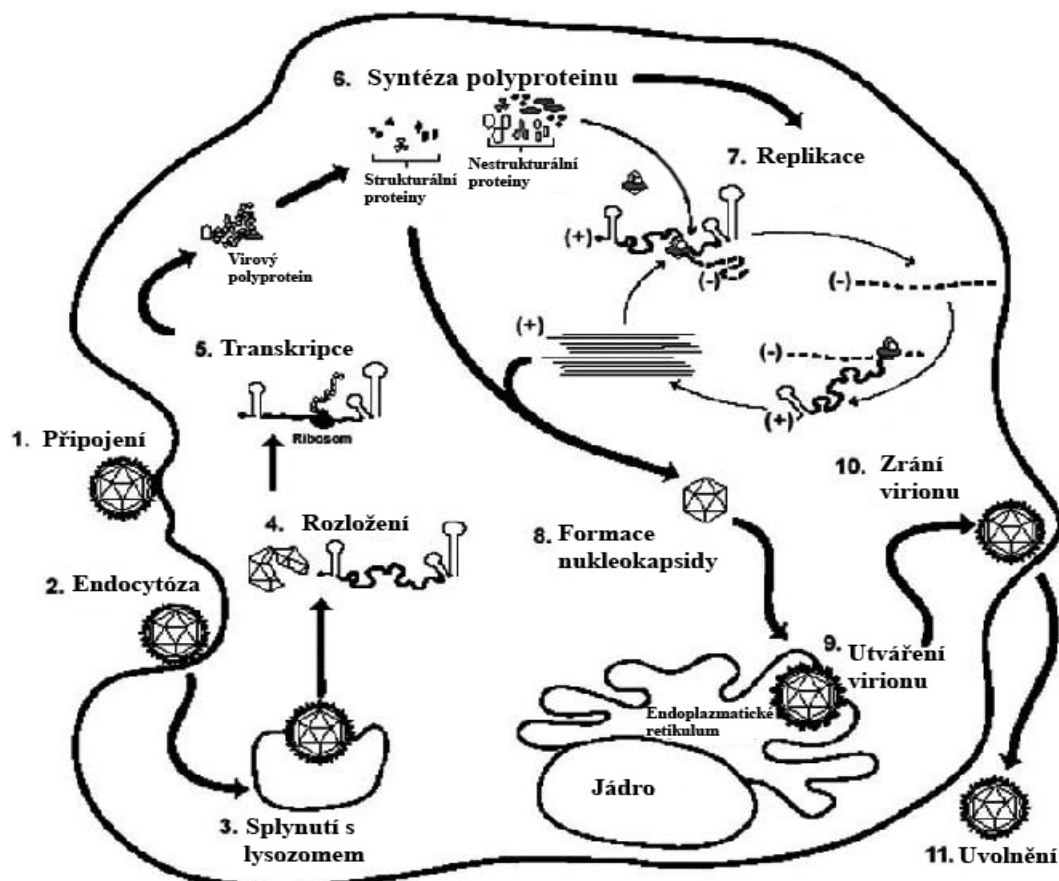
Povrch virionů KE je hladký bez ostrých výběžků a skládá se hlavně z proteinu E, který vytváří síť zhuštěných podjednotek (Heinz *et al.*, 2001).

V posledních letech jsou v elektronové mikroskopii hojně využívány kryometody, které umožňují zachování jemných strukturních detailů a tím také mnohem podrobnější studium uspořádání povrchu virionu a rekombinantních subvirových částic (Ferlenghi *et al.*, 2001). Subvirové částice, zkráceně RSP částice (recombinant subviral particles) neobsahují kapsidu, tvoří je pouze membrána obsahující proteiny E a M (Allison *et al.*, 1995; Schlich, 1996). RSP částice jsou produkovány infikovanou buňkou patrně jen jako vedlejší produkt (Lindenbach, 2001). Jsou o něco menší než kompletní virová částice (30 nm oproti 50 nm), ale jejich mechanismus vzniku je podobný jako u virionu. Nejprve vzniká nezralá forma RSP (obsahující prM protein), transportuje se buňkou, prM protein se štěpí na pr a M a částice dozrává. Nakonec je uvolněna z buňky. RSP částice mají podobné uspořádání E proteinů jako kompletní virion; viriony mají proteiny E uspořádané do T=3 mříže a RSP částice do T=1 mříže (Ferlenghi *et al.*, 2001). RSP částice jsou výbornými ochrannými imunogeny (Heinz *et al.*, 1995). S neutralizujícími monoklonálními protilátkami reagují identicky jako virion a jejich proteiny vykazují ty samé funkční aktivity v hemaglutinačních pokusech (Lindenbach *et al.*, 2001). Mají tedy ideální vlastnosti pro přípravu nereplikující se rekombinantní vakcíny proti klíšťové encefalitidě.

2.1.5. Replikační cyklus

Replikační cyklus viru KE začíná navázáním virionu na obal hostitelské buňky pomocí velkého obalového glykoproteinu E. Není ještě zcela jasné, k jakým buněčným receptorům se virion váže. Předpokládá se ale, že v počáteční fázi cyklu hrají roli heparin sulfát (HS) a další glykosaminoglykany, jež se hojně vyskytují na mnoha typech buněk včetně buněk různých tkání klíšťat i obratlovců. Po navázání na receptor se invaginací buněčné membrány virion endocytuje a uzavře do klatrinem obaleného endozomálního váčku. V tomto váčku dojde následně ke snížení pH, které indukuje konformační změny virového obalového proteinu E a reorganizuje ho tak, že se z dimerů vytváří trimery. E protein následně zasáhne do membrány endosomu, to zapříčiní fúzi virové a endosomální membrány (Holzmann *et al.*, 1995; Helenius, 1995), virová nukleokapsida je uvolněna do cytoplasmy hostitele a následně se uvolňuje virová RNA. Translací virové RNA pozitivní polarity se vytváří jeden dlouhý polyprotein, jehož štěpením

vznikají jednotlivé virové proteiny. Virová RNA-dependentní RNA polymeráza nasyntetizuje podle (+)RNA několik RNA vláken o negativní polaritě a ty pak slouží jako templát pro syntézu RNA pozitivní polarity. Intermediátem replikace je dvouvláknová molekula RNA. RNA pozitivní polarity je následně integrovaná do nově vznikajících kapsid, popřípadě dále slouží při translaci (Chambers *et al.*, 1990).



Obrázek 2.4: replikační cyklus flaviviru: (1) virus nasedne na buněčnou membránu a (2) vnikne do buňky pomocí endocytózy zprostředkované receptorem. (3) Po fúzi s lysozomem se rozloží kapsida a (4) uvolní se virová RNA. (5) (+)RNA se translatuje a (6) vznikají polyproteiny nestrukturální, (7) které se účastní replikace RNA a (8) také vznikají proteiny strukturalní, které se účastní skládání kapsidy. (9) Virové částice pučí z ER (10) hostitelská protéza štěpí protein prM a virion se stává zralým. (11) Virion je uvolněn z buňky fúzí váčku s buněčnou membránou. (Debashish aYong, 2006: upraveno).

Maturace virionu probíhá dvěma způsoby: trans a cis. U infikované savčí tkáňové linie byla pozorována maturace typu trans (Šenigl, 2000). Při ní jsou během syntézy polyproteinu odštěpeny obalové proteiny prM a E hostitelskou buněčnou signalázou a translokovány do lumen endoplasmatického retikula. Na cytoplasmatické straně endoplasmatického retikula vytváří (+) RNA společně s proteinem C nukleokapsidu. Virový obal se vytváří pučením nukleokapsidy do ER. Vzniklé nezralé neinfekční viriony (Elshuber *et al.*, 2003) se hromadí v měchýřcích

endoplasmatického retikula a pomocí transportních váčků jsou transportovány hostitelskou sekreční dráhou. Ve váčcích trans-Golgiho aparátu, kde je nízké pH, štěpí proteáza furin protein prM (Stadler *et al.*, 1997) a vzniká protein M a virion se stává zralým a infekčním. Transportní váček, ve kterém je transportován, splyne s plasmatickou membránou hostitelské buňky a virion je uvolněn z buňky (Mandl *et al.*, 2005). Infikovaná hostitelská buňka se vyznačuje hypertrofovaným endoplasmatickým retikulem.

V klíštěcích buňkách probíhá maturace cestou cis. Viriony jsou kompletovány v cytoplasmě, jsou transportovány k buněčné membráně, ve které se nacházejí proteiny M a E. Viriony pučí přes membránu a získávají tak svůj obal. Hostitelská buňka má pak fragmentované endoplasmatické retikulum (Šenigl, 2000).

2.1.6. Pasážování

Pasážováním můžeme všeobecně označit přenos buněčných linií, bakteriálních kolonií nebo virů do nového čerstvého kultivačního prostředí. Pasážování virů je proces, kdy infikujeme organismus, popř. buněčnou kulturu virem a po určité době kultivace virus opět izolujeme. V případě KE se nejčastěji využívají sající myšky, klíšťata nebo buněčné kultury. Inkubační doba i postup se liší. V případě pasážování na klíštěti se nechává virus množit přibližně 14 dní (Labuda *et al.*, 1994), pokud použijeme k pasážování myši, inkubujeme 4 až 5 dní do akutní fáze onemocnění. Pokud se pasážuje virus v buněčné kultuře, buňky se infikují v příslušném médiu a nechají se kultivovat přibližně 6 dní.

Pasážování viru ovlivňuje jeho neuroinvasivitu a neurovirulenci, z čehož plyne, že hostitel musí na virus působit určitým selekčním tlakem a měnit jeho genotyp (Gritsun *et al.*, 2003). Adaptace viru KE v klíšťatech či v savčím organismu způsobuje značné změny v antigenní struktuře obalového proteinu E, vytváří odlišné antigenní domény, včetně neutralizačních epitopů, které se účastní rané fáze interakce virionů s membránou buňky (Romanova *et al.*, 2006). Labuda s kolektivem (1994) zjistili, že sériové pasážování viru KE (kmen 4387 izolovaný z jater a plic hlodavce norníka rudého) na klíštěti *I. ricinus* způsobovalo postupné snižování virulence viru. Tuto skutečnost prokázali pomocí infikovaných klíšťat, která sála na laboratorních myškách a tím je infikovala virem. Po sedmém sériovém pasážování viru (kmen 4387/7) na klíštěti přežilo sání infikovaného klíštěte až 95% myší. Přestože infikované myši, které přežily, vykazovaly velmi malou nebo dokonce žádnou virémii, dal se z jejich mozků izolovat virus (odebírán 14. a 30. den po sání klíštěte). Tento fakt naznačuje, že i virus pasážovaný na klíštěti způsobuje u myší perzistentní infekci. Sekvenováním aminokyselinových

sekvencí obalového proteinu E zjistili odlišnost mezi atenuovaným kmenem 4387/7 a virulentními kmeny 4387 a Neudorfl (evropský prototypový kmen KE). U atenuovaného kmene došlo oproti virulentním kmenům k substituci aminokyseliny (z glutamové kyseliny na lysin) v proteinu E na 84. pozici. Tímto prokázali, že k fenotypové změně z virulentního fenotypu na atenuovaný postačuje dokonce jediná záměna aminokyseliny v obalovém proteinu E viru KE. Tento unikátní kodon je pravděpodobně zodpovědný za ztrátu hemaglutinační aktivity kmene 4387/7. V případě pasážování na klišťatech tedy dochází k postupné ztrátě virulence viru KE pro myš.

Obdobně lze pasážováním viru v mozcích sajících myšek zvýšit jeho virulenci, jak bylo prokázáno v naší laboratoři (Růžek *et al.*, 2008). Po pěti pasážích termosenzitivního kmene KE ts263, který byl izolován v jižních Čechách z klišťete *I. ricinus* v roce 1987 (Kopecký *et al.*, 1991) a vyznačoval se nízkou neuroinvazivitou, v mozcích sajících myšek se podařilo získat vysoce virulentní variantu původního viru 263-m5. Podobně pasážováním původního kmene v buněčné kultuře odvozené z prasečích ledvin za zvýšené teploty (40°C) se získala vysoce virulentní termorezistentní varianta 263-TR, vykazující vlastnosti podobné variantě 263-m5. Termorezistentní varianta (263-TR) byla sekvenována a její genom byl porovnán se sekvencí genomu varianty ts263. Sekvence aminokyselin strukturních proteinů a 5' nekódující oblasti byly u obou zcela totožné. To znamená, že termosenzitivitu a virulenci ovlivňují také sekvence kódující nestrukturní virové proteiny. (Růžek *et al.*, 2008).

Další studie ukázaly značný rozdíl ve virulenci v závislosti na druhu hostitele. Virus KE pasážovaný v klišťeti, byl nestabilní a ztrácel virulenci, ale po několika pasážích v savčím hostiteli se virulence (pro laboratorní myš) znovu obnovila (Chunikhin *et al.*, 1986; Dzhivanian *et al.*, 1988; Kaluzová *et al.*, 1994). Rychlou adaptaci viru na nové podmínky lze vysvětlit například vysokou frekvencí mutací při replikaci RNA; dalším vysvětlením je pak přítomnost více variant viru v izolátu/kmenu, přičemž jednotlivé varianty jsou zastoupeny v izolátu/kmenu v různé míře, tudíž se v různé míře také projevují.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Virus

Kmen Hypr byl izolován v roce 1953 na území Moravy z krve desetiletého nemocného dítěte (Pospíšil *et al.*, 1954) a následně pasážován na mozcích sajících myšek.

Hypr5 byl získán pěti pasážemi původního viru na mozcích sajících myšek.

Hypr50/CB byl mnohonásobně pasážován přes mozky sajících myšek, přesný počet pasáží však není znám. S určitostí však můžeme říci, že byl pasážován nejméně 50x. Pasážování bylo provedeno na pracovišti v Českých Budějovicích.

Hypr50/V byl stejně jako Hypr50/CB mnohonásobně pasážován, nejméně 50x, na pracovišti ve Vídni. V GenBanku je uložena jeho kompletní sekvence (U39292) pod názvem „Hypr“. Název „Hypr“ je také běžně používán v odborné literatuře pro tuto variantu.

Neudoerfl je prototypický kmen viru KE Západního subtypu. Původně byl izolovaný z klíštěte v Rakousku, ve městě Burgeland v roce 1971. Kompletní sekvence jeho genomu (U27495) je uložena v databázi GenBank.

3.1.2. Složení roztoků

TAE pufr, 50x zásobní roztok: 242 g Tris base, 57,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA, (pH 8,5), H₂O do 1000 ml.

TE pufr: 10 mM Tris-HCl (pH=8), 1mM EDTA (pH=8.3). Tris-HCl: Tris-acetát, ledová kys. octová, isopropanol, agaróza.

3.2. Metody

3.2.1. Izolace RNA

Virová RNA byla izolována z mozkové suspenze s vysokým titrem viru. Izolace byla provedena pomocí kitu *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen) přesně podle instrukcí výrobce. RNA byla eluována do objemu 60 µl, hluboce zmrazena a skladována za teploty -70°C.

3.2.2. Reverzní transkripce (RT- PCR)

Informace z izolované RNA byla pomocí reverzní transkripce přepsána do cDNA. Reverzní transkripce byla provedena pomocí kitu *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) přesně podle firemního protokolu. Pro syntézu cDNA byl použit

příslušný primer 1F (Generi Biotech). Bylo získáno 40 µl cDNA, která byla uchována při teplotě -70°C.

3.2.3. PCR (polymerázová řetězová reakce)

cDNA, získaná reverzní transkripcí, byla použita jako templát pro následnou amplifikaci DNA pomocí PCR. Reakční směs obsahovala 1µl cDNA, 10µl PPP mastermixu (Top Bio), 1µl každého primeru (0,01mM), 7µl deionizované vody (výsledný objem představoval 20µl). PCR reakce probíhala v přístroji Mastercycler (Eppendorf).

Postup PCR byl následující:

- denaturace při 95°C po dobu 5 min,
- 30x se opakující cyklus skládající se z denaturace při 95°C po dobu 35 s, z annealingu při teplotách odpovídajících užitým kombinacím primerů (viz. Tab.1) po dobu 35 s a z elongace při 72°C po dobu 35s,
- závěrečná elongace při teplotě 72°C trvající 7min,
- udržování teploty na 14°C.

3.2.4. Agarózová elektroforéza

K separaci a vizualizaci úseků DNA byla využita agarózová elektroforéza. K získanému PCR produktu byl přidán 5x koncentrovaný vzorkový pufr, obsahující fluorescenční barvu SYBR Green a směs byla pipetována do jamky v 1% agarózovém gelu. Po elektroforetické separaci byl výsledek pozorován v modrém světle o vlnové délce 480 nm na přístroji *Visi-BlueTM Transilluminator*.

Velikost fragmentů DNA získaných pomocí PCR byla zjištěna porovnáním s odpovídajícím úsekem DNA markeru (O'Gene Ruler 1 kb DNA ladder, Fermentas); tyto úseky byly vyříznuty z agarózového gelu skalpelem. Z vyříznutých vzorků byla následně eluována DNA.

3.2.5. Eluce DNA z gelu

K eluci DNA z gelu byl využit kit *MinElute Gel Extraction Kit* (Qiagen); podle firemních instrukcí byla získána DNA rozpuštěná v 30 µl TE pufru. V takto získaném vzorku byla zjištěna koncentrace DNA pomocí fluorescenčního spektrometru Qubit (Invitrogen); poté byla provedena sekvenční analýza.

3.2.6. Sekvenční analýza

Pomocí přímé sekvenční analýzy obou vláken získaného PCR produktu byly zjištěny nukleotidové sekvence amplifikované DNA. Pro sekvenační reakce byly použity 4µl DNA a 1µl příslušného primeru (0,01M). Sekvenční analýzy byly provedeny na přístroji ABI PRISM 3130xl firmy Applied Biosystems v Laboratoři genomiky, společné laboratoři PřF JU a BC AVČR (Biologického centra Akademie věd České republiky). Výsledky sekvenční analýzy byly zpracovány pomocí programu BioEdit (Hall, 1999) a WinGene (Hennig, 1999; <http://www.ipw.agrl.ethz.ch/~lhennig/winpep.html>) a srovnány se sekvencí variant Hypr50/CB a Hypr50/V a kmenu Neudoerfl.

3.2.7. Predikce sekundární struktury RNA

Pro predikci sekundární struktury úseků RNA byl použit program CLC RNA Workbench 2.1.2 (www.clcbio.com). Tento program predikuje sekundární strukturu na základě minimální volné energie s využitím algoritmu Prof. M. Zukera (Zuker, 1989).

3.2.8. 3D modely proteinu E

Struktury proteinu E jednotlivých variant viru KE byly navrženy na základě již známých struktur tohoto proteinu, dostupných v databázi Worldwide Protein Data Bank (www.wwpdb.org), která slučuje databáze RCSB PDB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB) (www.rcsb.org), EBI Macromolecular Structure Databáze – PDB Europe (www.ebi.ac.uk), Protein Data Bank Japan (www.pdbj.org) a Biologic Magnetic Resonance Bank (www.bmr.com).

Samotné modelování jednotlivých struktur probíhalo s využitím on-line servisu Pôle Bioinformatique Lyonnais Gerland, Geno3D (geno3d-pbil.ibcp.fr) (Combet et al., 2002). Přesnost výsledných modelů byla vyhodnocena programem PROCHECK v.3.5.4 (<ftp://ftp.biochem.ucl.ac.uk>, R. Laskowski, European Bioinformatics Institute, Cambridge, Velká Británie) a nejpřesnější model byl použit pro zobrazení struktur proteinu E jednotlivých variant viru.

Struktury proteinů jednotlivých variant byly porovnány programem Molsoft Browser v.3.4-9b (Molsoft L.L.C, La Jolla, CA, USA). V tomto programu byly zobrazeny odchýlky, vzniklé záměnou aminokyselin u proteinů a zobrazen byl i dopad na povrch molekul.

Pro výpočet elektrostatického potenciálu povrchu proteinů byl použit program Swiss-PdbViewer v.3.7 (Guex et al., 1997).

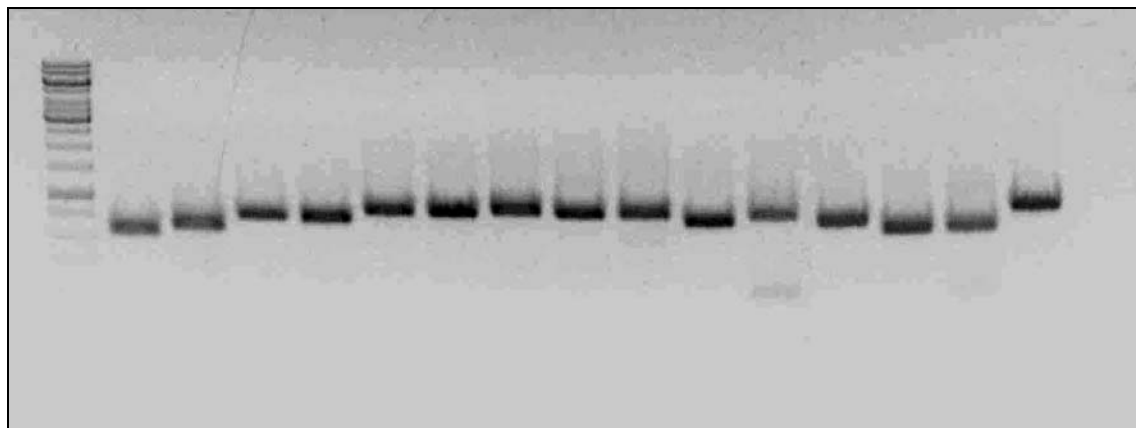
Tab. 1 Charakteristika primerů

Označení primeru	Polarita	Sekvence (5' → 3')	Annealingová teplota [°C]	Pozice v genomu
1A	Sense	TGT CTA CGC TTC GCG TTG CAC ACA	55	963-986
1B	Antisense	GGA ACC CCA GCG AGA GCC TTC AGT A	55	1787-1763
2A	Sense	CGT GTT GAA TTT GGG GCT CCT CAC G	54	1693-1717
2B	Antisense	TTC GTT CCG TGT CCA CAG CGC A	54	2491-2470
2C	Sense	GGT CAT TAC TCT GTT GGG GA	45	450-469
2D	Antisense	ACA CAT CCA TTG AAG GCT TC	45	1102-1083
2E	Sense	TTG TTC ACA CCA TTT CCA CG	50	9792-9811
1F	Antisense	AGC GGG TGT TTT TCC GAG TC	45	11141-11122
1G	Sense	TGG AGA CCA GAG AGG GCC AA	50,8	8400-8419
1H	Antisense	CTT CTT GAG GTG CCA GCC CA	50,8	9231-9212
2G	Sense	GAA ATT GGG AGA ATT CGG AGT GGC G	55	9048-9072
2H	Antisense	CGC CCT CCC AAC GAG TTC ATC TTG	55	9882-9859
2K	Sense	CTG TGG GGG TTT CTG CCT CT	50,8	7606-7625
2L	Antisense	GTT TCG CTG TAC TGC TCC CG	50,8	8540-8521
1M	Sense	GCT TTC AAC AGC ATC TTC GG	49	2302-2321
1N	Antisense	TGT TAT ACC AGG ATC TGG GTC C	49	3229-3208
2M	Sense	ACT TTT GGT CAC TGA CCT GAG G	49	3105-3126
2N	Antisense	TCC ATG ATG CAC AGT CAC CA	49	4032-4013
1O	Sense	GCT GGT CCT GGA ATT GGG GC	52,8	3855-3874
1P	Antisense	GGA CCG GCC ACA GCA TCA TC	52,8	4808-4789
2O	Sense	GGT CGA GAG CGT GGT GAT AG	50,8	4627-4646
2P	Antisense	CAG GAG GTG TCG CTG TCA TC	50,8	5575-5556
1R	Sense	CCT ATG TCA ACA GAC GGC TAC T	50	5408-5429
1S	Antisense	GGC TCC TAA AGG TAA CCA AGT C	50	6358-6337
2R	Sense	GCC CGT GGC CAC CTT CTA TG	52,8	6114-6133
2S	Antisense	CCC CCC GTT CAC TCC ACA AC	52,8	6976-6957

4. Výsledky

4.1. PCR varianty Hypr5

Byla provedena kompletní polymerázová řetězová reakce virového genomu kmenu Hypr, varianty Hypr5 viz. obrázek 4.1



Obrázek 4.1: fotografie úseků DNA separovaných v agarózovém gelu elektroforézou

Úseky DNA za použití primerů (zleva):

- 1) 1C – 1D
- 2) 2C – 2D
- 3) 1A – 1B
- 4) 2A – 2B
- 5) 1M – 1N
- 6) 2M – 2N
- 7) 1O – 1P
- 8) 2O – 2P
- 9) 1S – 1R
- 10) 2S – 2R
- 11) 1K – 1L
- 12) 2K – 2L
- 13) 1G – 1H
- 14) 2G – 2H
- 15) 2E – 1F

4.2. Kompletní genomová sekvenční analýza viru klíšťové encefalidity kmene Hypr, varianty Hypr5 a Hypr50/CB

Ve snaze identifikovat úseky genomu viru klíšťové encefalidity, které mohou být ovlivněny pasážováním v savčím hostiteli, byla provedena kompletní sekvenční analýza

virového genomu kmenu Hypr, varianty Hypr5 (Příloha 9.1) a varianty Hypr50/CB (Příloha 9.2). Genomová sekvence varianty Hypr5 byla následně porovnána jak s variantou Hypr50/CB, tak s dříve publikovanou sekvencí varianty Hypr50/V (označované jako „Hypr“). Hypr5 představuje původnější variantu viru Hypr, která prodělala jen pět pasáží v mozcích sajících myšek, v porovnání s variantami Hypr50/CB a Hypr50/V, které byly pasážovány minimálně padesátkrát na dvou různých pracovištích.

Porovnání nukleotidových sekvencí všech variant viru Hypr a z nich vyplývajících aminokyselinových změn v sekvencích virových proteinů jsou shrnuty v Tabulce 2. Pasáží viru došlo u Hypr50/CB ke změnám ve 21 nukleotidech, které měly za následek změnu v 8 aminokyselinách proti Hypru5, virus Hypr50/V se změnil dokonce ve 27 nukleotidech, jejichž změna způsobila substituci 13 aminokyselin v porovnání s původní variantou Hypr5.

Pasážování rovněž ovlivnilo i 5' NCR, kdy se u varianty Hypr50/V objevila nukleotidová záměna v 13. nukleotidu z A na G. Tato záměna nemá vliv na sekundární strukturu 5' NCR genomu viru (obrázky 4.2 a 4.3).

U genů, kódujících proteiny C a prM se vyskytly jenom nukleotidové záměny, které neměly dopad na aminokyselinové sekvence daných proteinů, přičemž záměna v proteinu C (410. pozice v nt sekvenci) byla společná pro oba vysoce pasážované kmény.

Co se týče nesynonymních záměn byl nejvíce pozměněn pasážováním v savčích buňkách protein E a jeho kódující nt sekvence také obsahovala další synonymní záměny, z nichž jedna byla společná u obou variant (1188. pozice v nt sekvenci viru). Dvě z aminokyselinových záměn byly také společné u obou variant (v pozici 274. V→A a v pozici 485. G→V), z nichž jedna se vyskytuje i u kmene Neudoerfl (v pozici 274. V→A).

Souhrnně lze říci, že k nejvíce záměnám v sekvenci aminokyselin v proteinu E došlo u varianty Hypr50/V, dohromady šest aminokyselinových záměn (v pozici 55. K→Q, v pozici 233. Q→R, v již zmíněné 274. pozici V→A, v pozici 390. H→Y, v pozici 437. V→L a v opět již zmíněné pozici 485. G→V), u varianty Hypr50/CB došlo pouze ke třem aminokyselinovým záměnám (pozice 274. a 485. byly již zmíněny, navíc došlo k záměně v pozici 67. D→G).

V genech kódujících NS1 protein došlo u obou vysoce pasážovaných variant kmene Hypr ke změně v pozici 156. (M→V) a tato změna se vyskytovala u obou variant vysoce pasážovaného kmenu Hypr. Navíc došlo u varianty Hypr50/CB v pozici 161. ke změně V→I.

Co se týče změn v proteinu NS2A, nastala jediná záměna, která měla dopad na AMK sekvenci a to ve variantě Hypr50/V v pozici 184. V→I.

V proteinu NS2B nastaly nt záměny, které neměly dopad na aminokyselinové sekvence a to v 4524. pozici genomu, kde došlo k synonymní záměně u obou sledovaných vysocepasážovaných variant. Změny, které způsobily záměnu v aminokyselinové sekvence se vyskytly jen u varianty Hypr50/V, v pozici 114. L→I a v pozici 124. E→K.

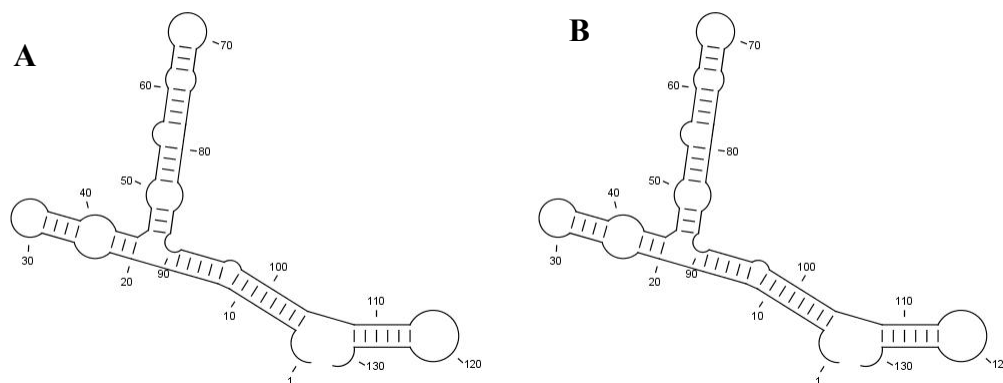
U genů kódujících protein NS3 došlo ke změně u obou variant Hypr50 a to v pozici 580. D→G. Navíc se objevila změna ve variantě Hypr50/CB v pozici 347. N→D.

V proteinech NS4A a NS4B došlo pouze ke změnám v nukleotidové sekvenci, které však neměly dopad na sekvenci aminokyselin.

Geny kódující NS5 protein vykazovaly nejvíce synonymních změn shodných u obou vícepasážovaných variant kmenu Hypr. Jediná nesynonymní změna se vyskytla v pozici 897. N→R a byla shodná pro obě varianty Hypr50.

Secondary structure: $\Delta G = -38,4\text{kcal/mol}$

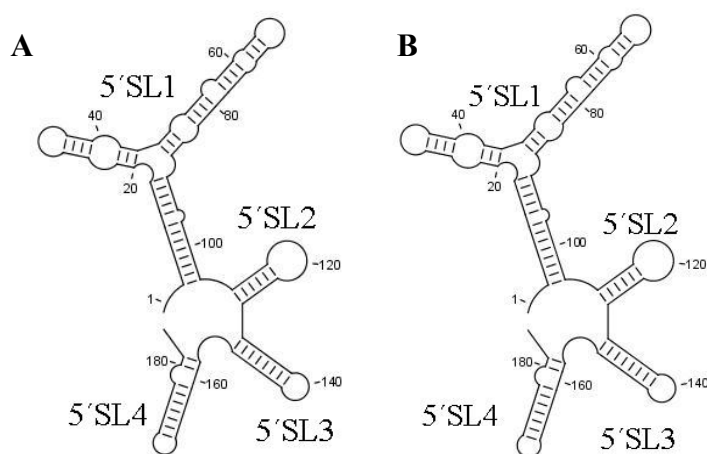
Secondary structure: $\Delta G = -38,4\text{kcal/mol}$



Obrázek 4.2: A – sekundární struktura 5'UTR oblastí genomu variant Hypr5, Hypr50/CB. B – sekundární struktura 5'UTR oblastí genomu varianty Hypr50/V.

Secondary structure: $\Delta G = -65,7\text{kcal/mol}$

Secondary structure: $\Delta G = -65,3\text{kcal/mol}$



Obrázek 4.3: A – sekundární struktura 5'-konce genomu (1-183 nt) variant Hypr5, Hypr50/CB. B – sekundární struktura 5'-konce genomu (1-183 nt) varianty Hypr50/V.

Rozdíl v nukleotidové sekvenci				Rozdíl v aminokyselinové sekvenci			
Pozice v genomu	Hypr 5	Hypr50/CB	Hypr50/V	protein	Hypr5	Hypr50/CB	Hypr5/Hypr50V
13	A		G	5'NCR	A (5)		T
410	G	A	A	C		synonymní záměna	synonymní záměna
726	G	A		pr		synonymní záměna	
1135	A		C	E	K (55)		Q
1172	A	G		E	D (67)	G	
1188	T	C	C	E		synonymní záměna	synonymní záměna
1239	C		T	E			synonymní záměna
1670	A		G	E	Q (233)		R
1793	T	C	C	E	V*(274)	A*	A*
2109	G		A	E			synonymní záměna
2140	C		T	E	H (390)		Y
2281	G		T	E	V (437)		L
2426	G	T	T	E	G (485)	V	V
2926	A	G	G	NS1	M*(156)	V*	V*
2941	G	A		NS1	V (161)	I	
3630	G		A	NS2A			synonymní záměna
3852	T	A		NS2A		synonymní záměna	
4069	G		A	NS2A	V (184)		I
4323	G		A	NS2B			synonymní záměna
4524	A	G	G	NS2B		synonymní záměna	synonymní záměna
4546	C		A	NS2B	L (114)		I
4576	G		A	NS2B	E (124)		K
5154	C	T		NS3		synonymní záměna	
5271	G		A	NS3			synonymní záměna
5428	C		T	NS3			synonymní záměna
5638	A	G		NS3	N (347)	D	
6338	A	G	G	NS3	D (580)	G	G
6870	T	C		NS4A		synonymní záměna	
6987	A		G	NS4B			synonymní záměna
7062	C	T		NS4B		synonymní záměna	
7221	G	A		NS4B		synonymní záměna	
8844	T	C	C	NS5		synonymní záměna	synonymní záměna
9783	G	A	A	NS5		synonymní záměna	synonymní záměna
10353	G	C	C	NS5		synonymní záměna	synonymní záměna
10355	A	G	G	NS5		synonymní záměna	synonymní záměna
10356	C	A	A	NS5	N*(897)	R*	R*

Tabulka 2.: rozdíly v nukleotidové a aminokyselinové sekvenci variant Hypr50/CB a Hypr50/V

Vysvětlivky: * značí změnu AMK, která se vyskytuje u všech sledovaných variant a kmenů: Hypr50/V, Hypr50/CB a vyskytuje se i u prototypového kmenu Neudoerfl. Číslo v závorce značí pozici aminokyseliny v proteinu

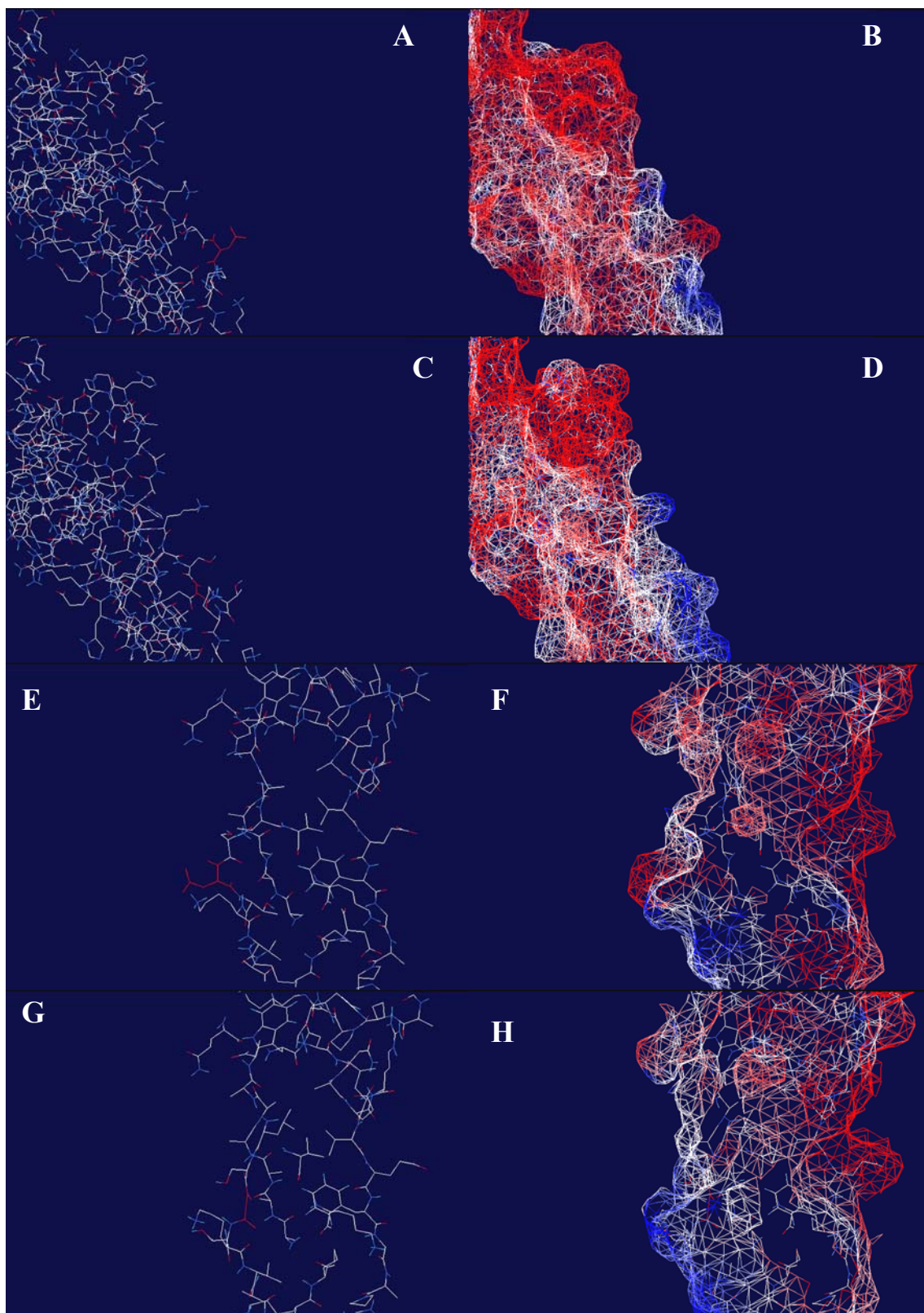
4.3. 3D modely proteinu E

Provedla jsem modelování struktur proteinu E u všech tří variant s ohledem na jednotlivé záměny (v rozsahu aminokyselin 1 až 401 dle dostupných modelů proteinu). Při porovnání variant Hypr5 a Hypr50/CB jsem porovnávala záměnu $D_{67} \rightarrow G$, kdy jsem pozorovala změnu v prostorovém uspořádání aminokyselinových zbytků (Obr. 4.3.1 a 4.3.2) a především ztrátu výrazné oblasti záporného náboje na povrchu proteinu (Obr. 4.3.1). U záměny $V_{274} \rightarrow A$ se záměna neprojevila výraznou změnou v prostorovém uspořádání (Obr. 4.3.4), díky přeskupení okolních aminokyselinových zbytků ale došlo k výrazné změně nábojů na povrchu proteinu, kdy vznikla jednolitá oblast záporného náboje (Obr. 4.3.3).

Při porovnání variant Hypr5 a Hypr50/V jsem také porovnávala jednotlivé záměny s výjimkou záměny $V_{274} \rightarrow A_{274}$, která je společná pro obě vysoce pasážované varianty. Záměny $V_{437} \rightarrow L_{437}$ a $G_{485} \rightarrow V_{485}$ nebyly modelovány, protože nejsou zahrnuty do známých struktur proteinu E. Při záměně $K_{55} \rightarrow Q_{55}$ nebyla pozorovaná velká změna prostorového uspořádání molekuly aminokyselinových zbytků (Obr. 4.3.6), došlo však k výraznému ovlivnění okolních struktur (Obr. 4.3.5). Bylo také pozorováno ovlivnění náboje na povrchu proteinu, kdy došlo ke vzniku velké oblasti s kladným nábojem (Obr. 4.3.5). V případě záměny v pozici 233 ($Q \rightarrow R$) jde o změnu na aminokyselinu s delším postranním řetězcem a s kladným nábojem, což se projevilo stericky (aminokyselinový zbytek míří mimo molekulu proteinu a zasahuje tedy víc do okolí (Obr. 4.3.7 a 4.3.8), přičemž tato aminokyselina vytváří kladně nabitý výstupek (Obr. 4.3.7).

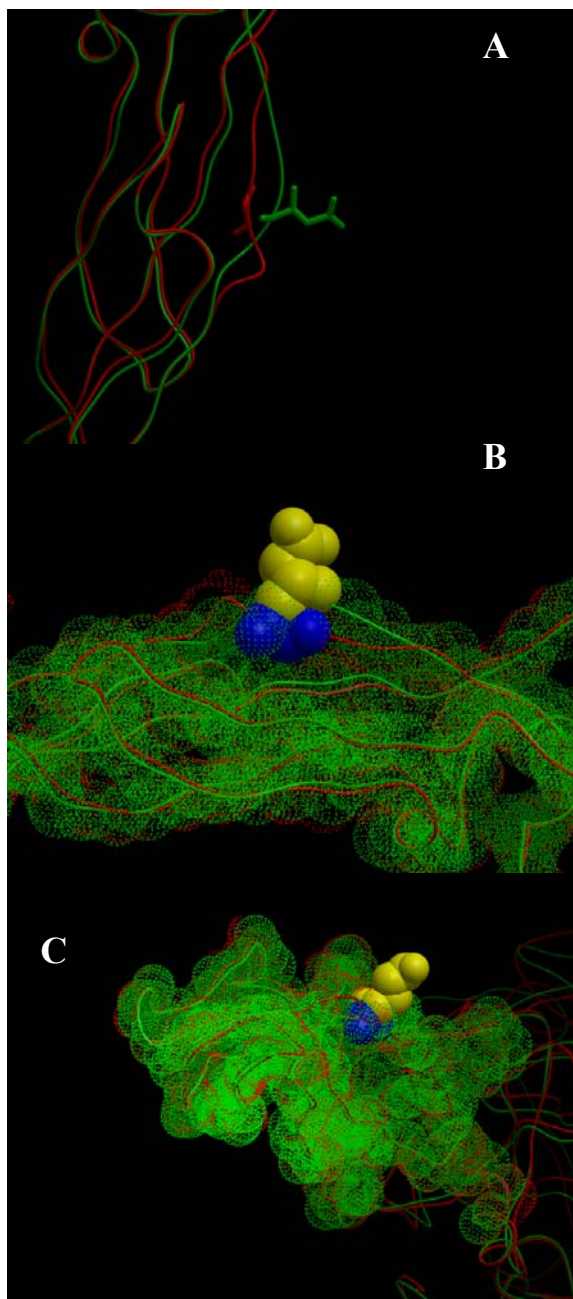
U záměny $V_{274} \rightarrow A_{274}$ jsem pozorovala jen malý sterický projev (Obr. 4.3.9). Podobně jako v případě varianty Hypr50CB se záměna projevila vznikem velké oblasti záporného náboje (Obr. 4.3.3). Y_{390} ve variantě Hypr50/V zaujímá oproti H_{390} v Hypru5 jemně posunutou pozici (Obr. 4.3.11) a v okolí záměny se zmenšila oblast se záporným nábojem na povrchu proteinu (Obr. 4.3.10).

3'NCR konec genomu nebyl pasážováním ovlivněn, ani u jedné z vysoce pasážovaných variant nebyly pozorovány záměny oproti původnější variantě.

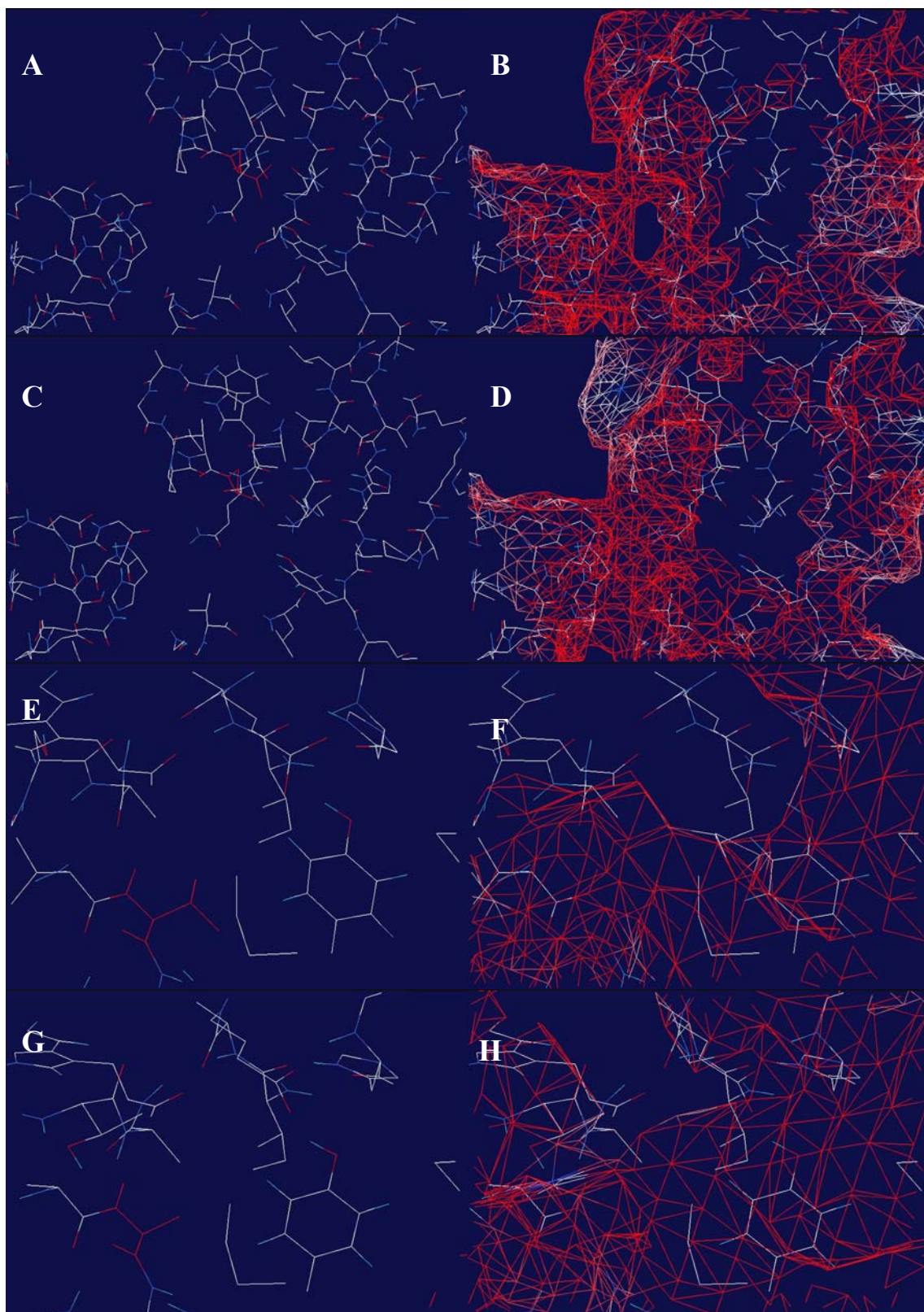


Obrázek 4.3.1: 3D modely proteinu E klíšťovej encefalidity. A, E – zobrazení struktury časti proteinu E, varianta Hypr5, červenou barvou je zvýrazněna aminokyselina D₆₇; C, G – zobrazení struktury časti proteinu E, varianta Hypr50/CB, červenou je zvýrazněna aminokyselina Q₆₇; B, F – zobrazení elektrostatického potenciálu na povrchu dané časti proteinu E, varianta Hypr5; D, H – zobrazení elektrostatického potenciálu na povrchu dané časti

proteinu E, varianta Hypr50/CB. A, B, C, D a E, F, G, H představují zobrazení molekuly z toho samého úhlu pohledu. U zobrazení elektrostatického potenciálu je záporný náboj znázorněn červeně a kladný modře (Swiss-PdbViewer).

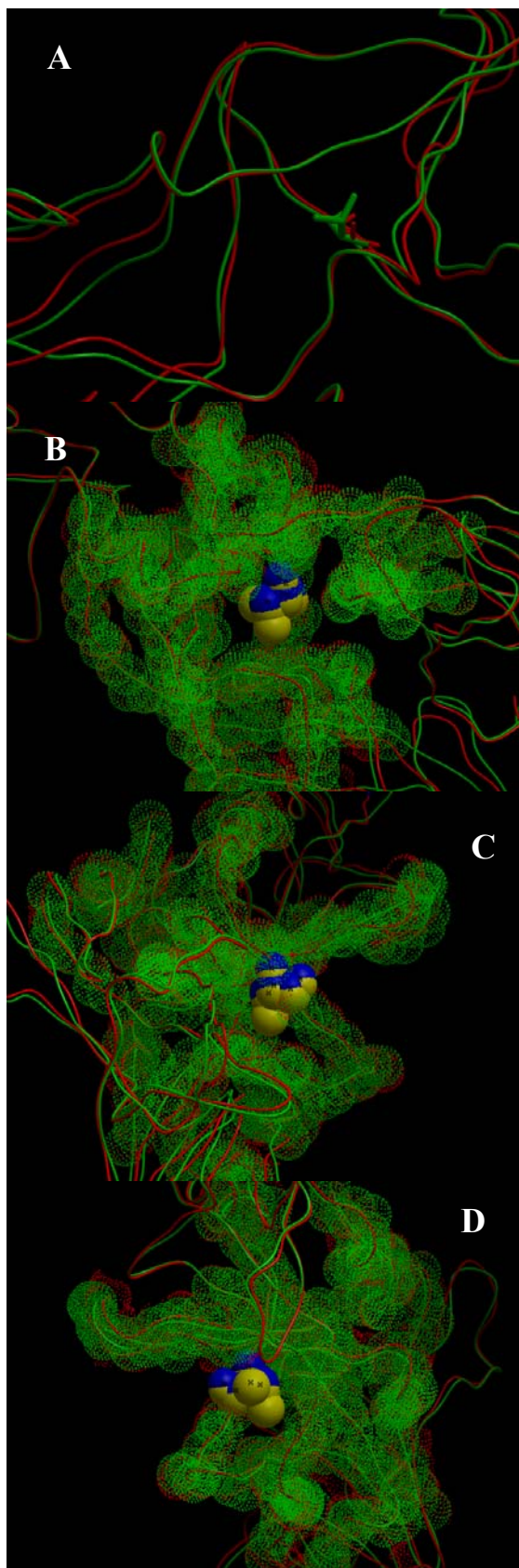


Obrázek 4.3.2: Porovnání struktur proteinu E viru klíšťové encefalitidy. Zelenou barvou je znázorněn protein E u varianty Hypr50/CB, červenou barvou u varianty Hypr5. U části molekuly je zobrazena odpovídajícími barvami i prostorová organizace jednotlivých molekul. Žlutou barvou je zobrazena aminokyselina D₆₇ u varianty Hypr50/CB, modrou barvou aminokyselina G₆₇ u varianty Hypr5 (Molsoft Browser).

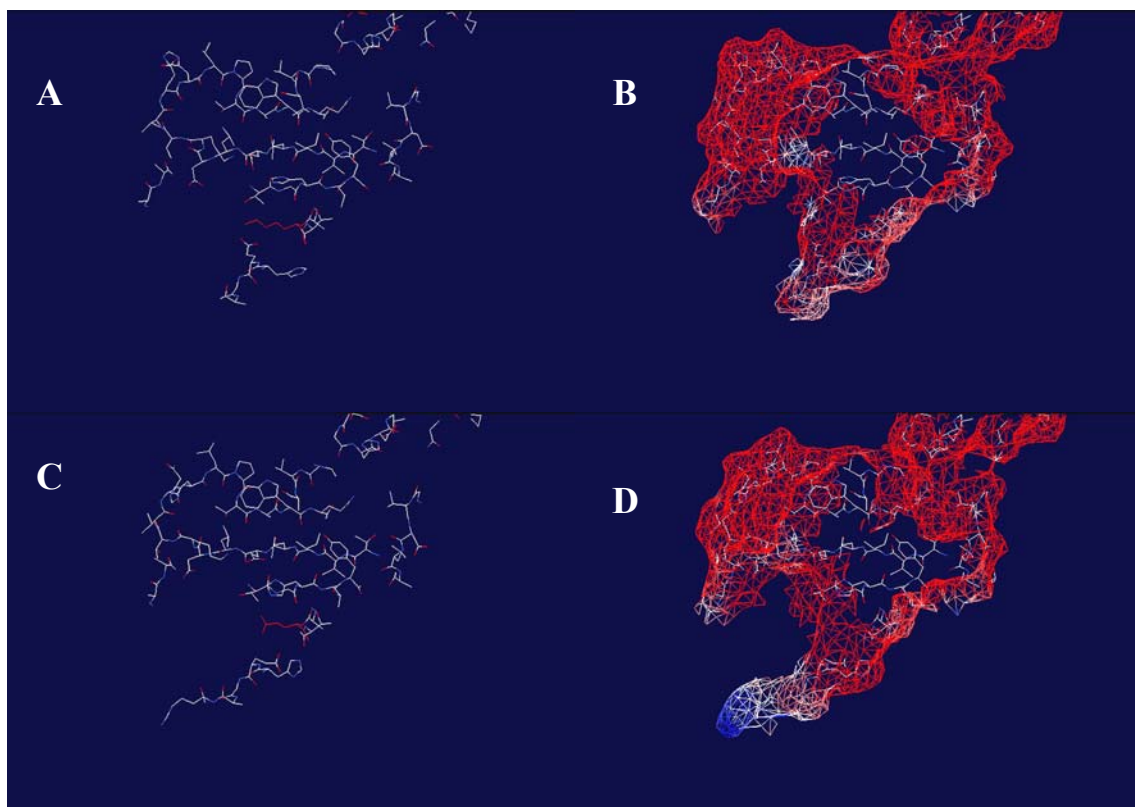


Obrázek 4.3.3: 3D modely proteinu E klíš'ové encefalidity. A, E – zobrazení struktury části proteinu E, varianta Hypr5, červenou barvou je zvýrazněna aminokyselina V_{274} ; C, G – zobrazení struktury části proteinu E, varianta Hypr50/CB, červenou je zvýrazněna aminokyselina A_{274} ; B, F – zobrazení elektrostatického potenciálu na povrchu dané části proteinu E, varianta Hypr5; G, H – zobrazení elektrostatického potenciálu na povrchu dané části

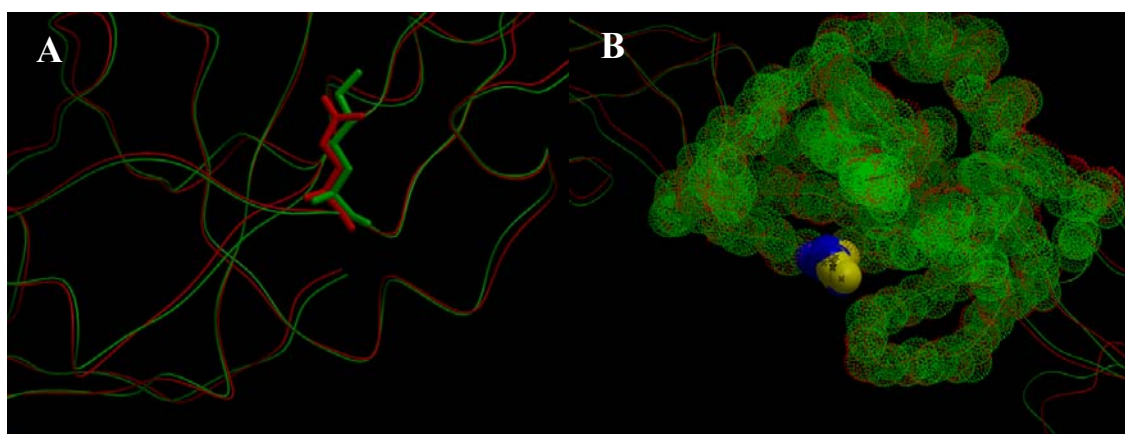
proteinu E, varianta Hypr50/CB. A, B, C, D a E, F, G, H představují zobrazení molekuly z toho samého úhlu pohledu. U zobrazení elektrostatického potenciálu je záporný náboj znázorněn červeně a kladný modře (Swiss-PdbViewer).



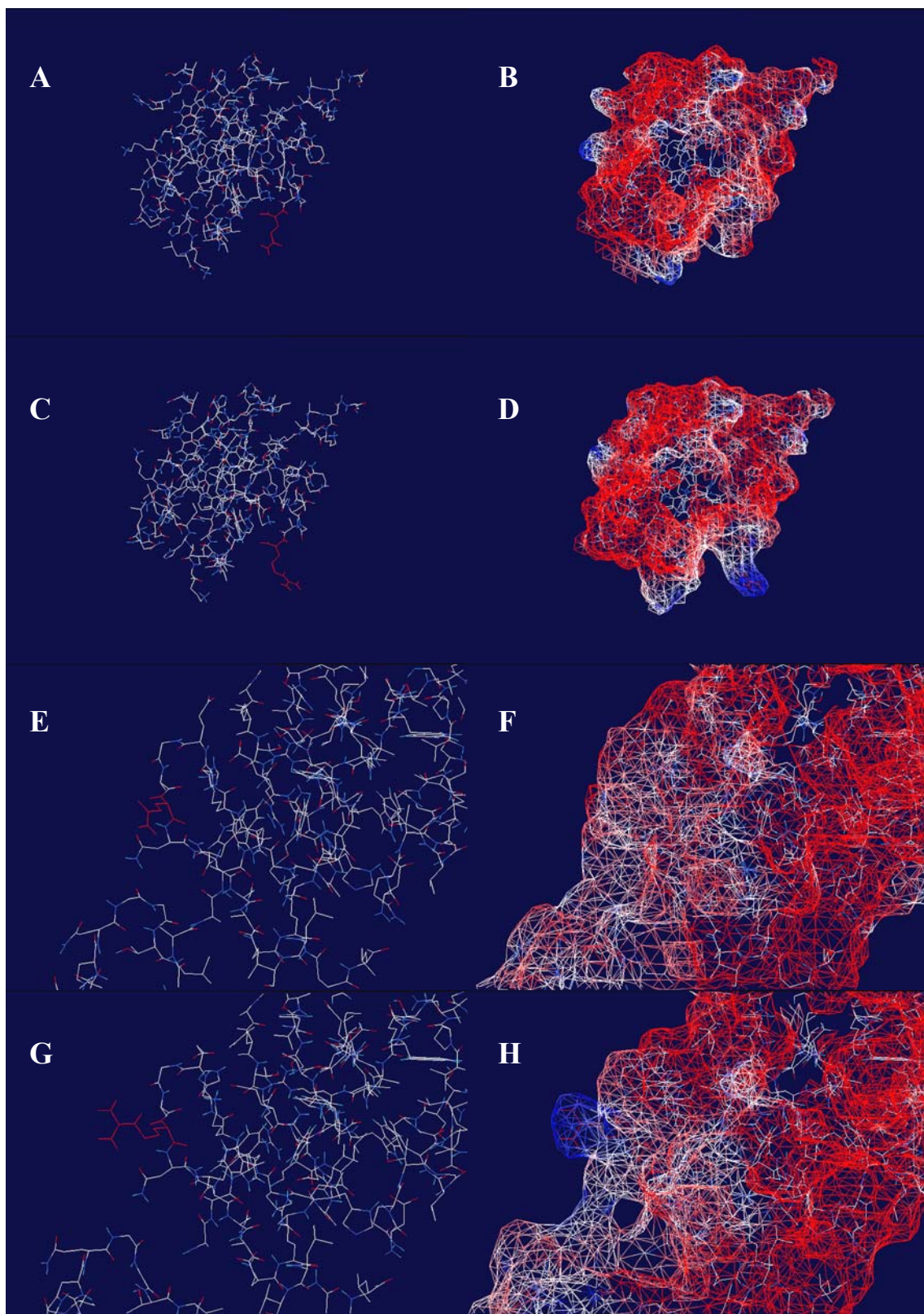
Obrázek 4.3.4: Porovnání struktur proteinu E viru klíšťové encefalitidy. Zelenou barvou je znázorněn protein E u varianty Hypr5, červenou barvou u varianty Hypr50/CB. U části molekuly je zobrazena odpovídajícími barvami i prostorová organizace jednotlivých molekul. Žlutou barvou je zobrazena aminokyselina V₂₇₄ u varianty Hypr5, modrou barvou aminokyselina A₂₇₄ u varianty Hypr50/CB (Molsoft Browser).



Obrázek 4.3.5: 3D modely proteinu E klíšťové encefalitidy. A – zobrazení struktury části proteinu E, varianta Hypr5, červenou barvou je zvýrazněna aminokyselina K₅₅; C – zobrazení struktury části proteinu E, varianta Hypr50/V, červenou je zvýrazněna aminokyselina Q₅₅; B – zobrazení elektrostatického potenciálu na povrchu dané části proteinu E, varianta Hypr5; D – zobrazení elektrostatického potenciálu na povrchu dané části proteinu E, varianta Hypr50/V (Swiss-PdbViewer).

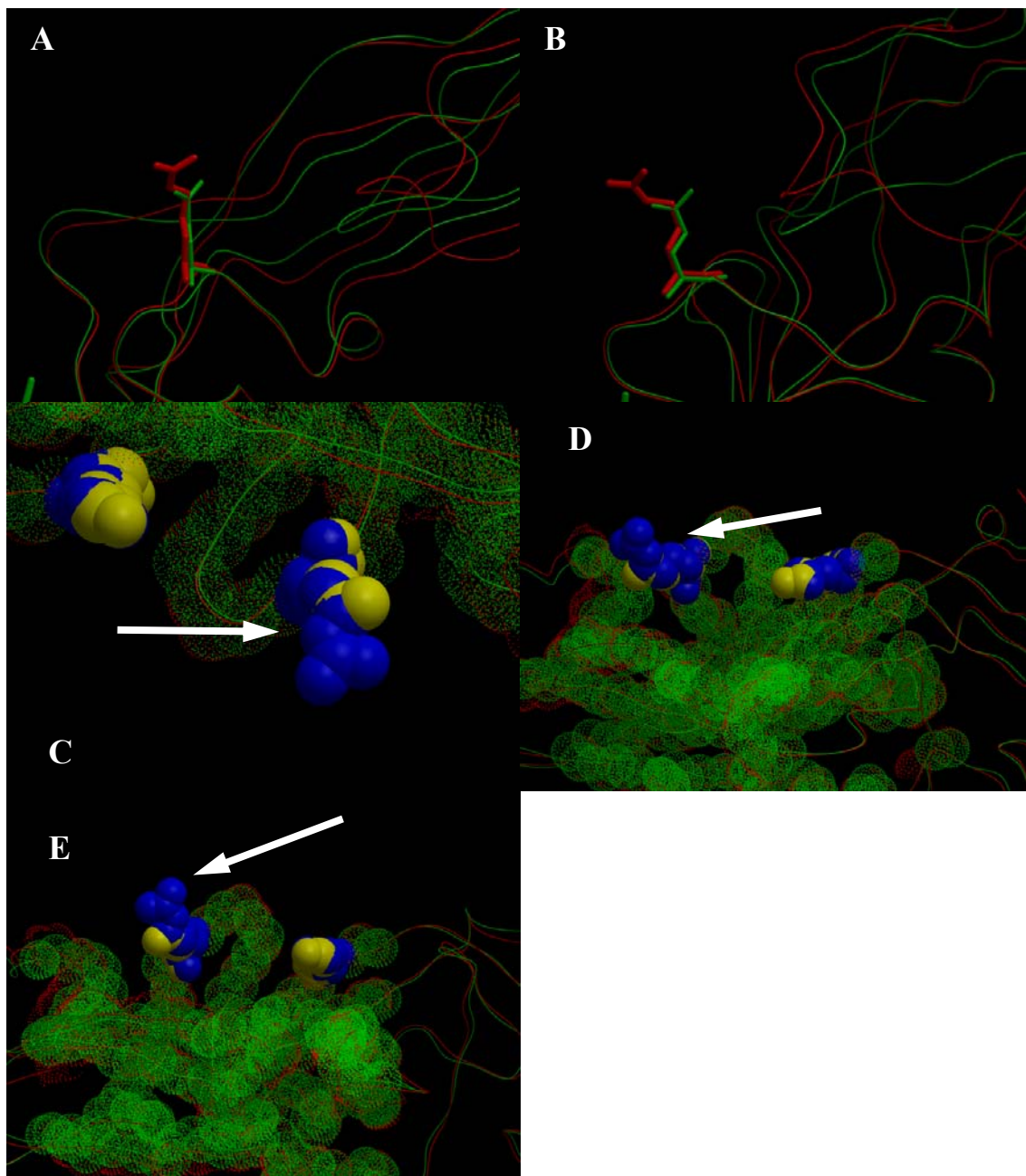


Obrázek 4.3.6.: Porovnání struktur proteinu E viru klíšťové encefalitidy. Zelenou barvou je znázorněn protein E u varianty Hypr5, červenou barvou u varianty Hypr50/CB. U části molekuly je zobrazena odpovídajícími barvami i prostorová organizace jednotlivých molekul. Žlutou barvou je zobrazena aminokyselina K₅₅ u varianty Hypr5, modrou barvou aminokyselina Q₅₅ u varianty Hypr50/CB (Molsoft Browser).

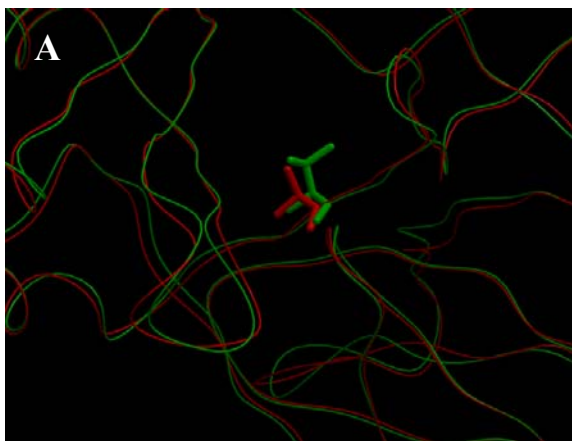


Obrázek 4.3.7.: 3D modely proteinu E klíšťovej encefalidity. A, E – zobrazení struktury časti proteinu E, varianta Hypr5, červenou barvou je zvýrazněna aminokyselina Q₂₃₃; C, G – zobrazení struktury časti proteinu E, varianta Hypr50/V, červenou je zvýrazněna aminokyselina R₂₃₃; B, F – zobrazení elektrostatického potenciálu na povrchu dané časti proteinu E, varianta Hypr5; D, H – zobrazení elektrostatického potenciálu na povrchu dané časti

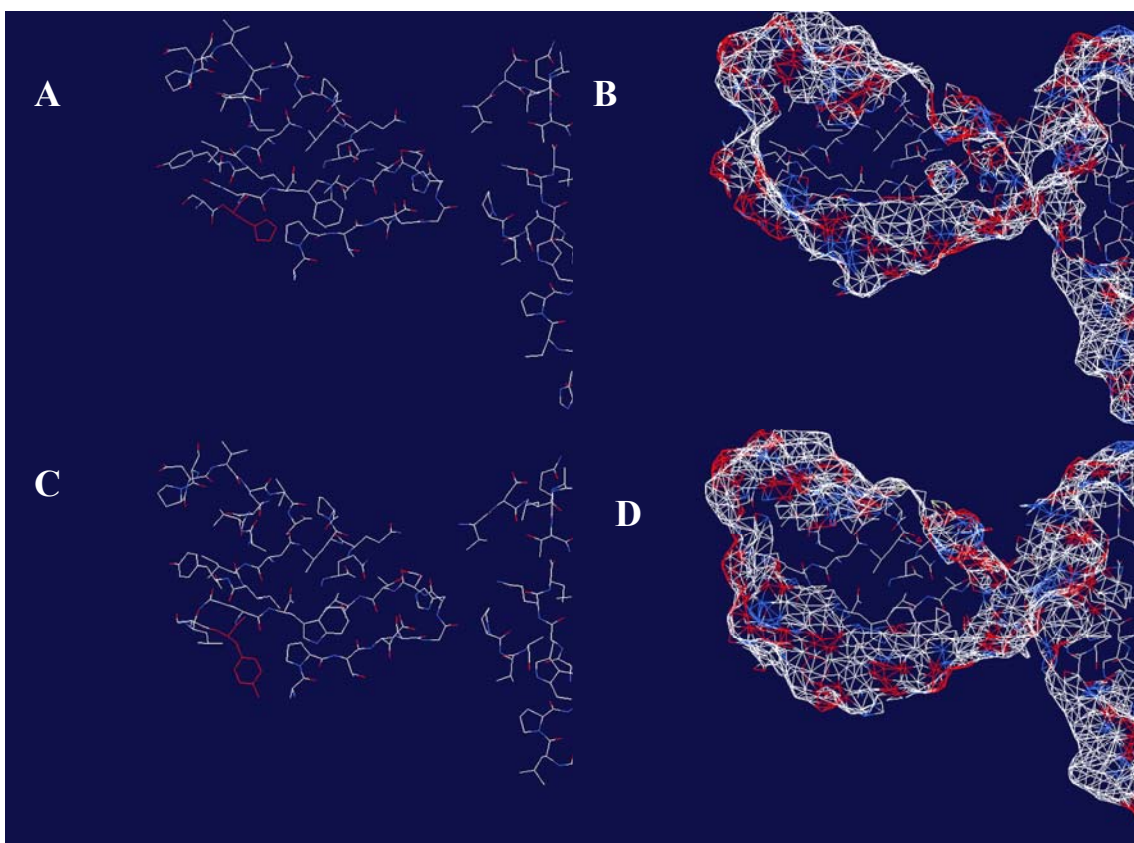
proteinu E, varianta Hypr50/V. A, B, C, D a E, F, G, H představují zobrazení molekuly z toho samého úhlu pohledu. U zobrazení elektrostatického potenciálu je záporný náboj znázorněn červeně a kladný modře (Swiss-PdbViewer).



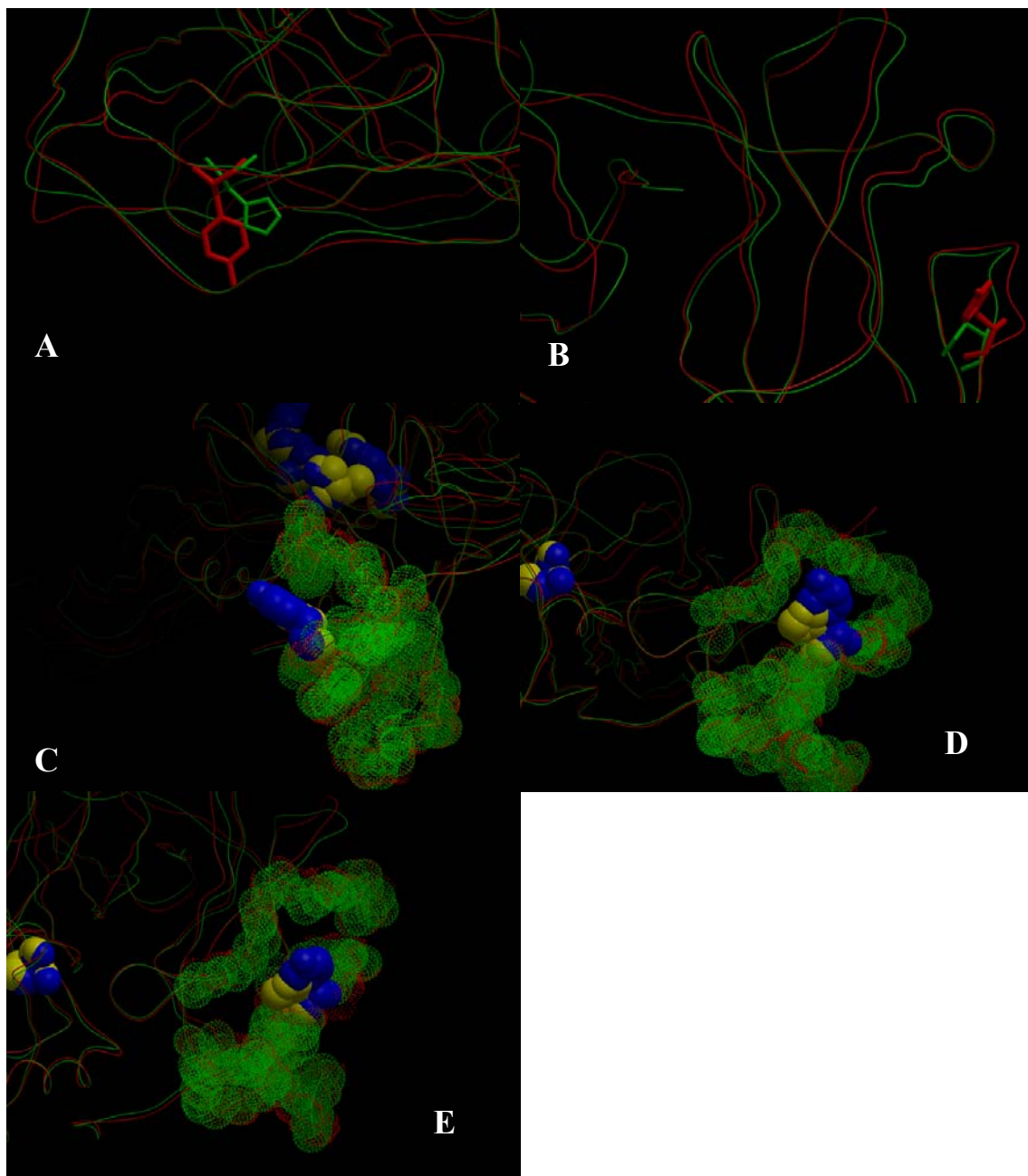
Obrázek 4.3.8: Porovnání struktur proteinu E viru klíšové encefalitidy. Zelenou barvou je znázorněn protein E u varianty Hypr5, červenou barvou u varianty Hypr50/CB. U části molekuly je zobrazena odpovídajícími barvami i prostorová organizace jednotlivých molekul. Žlutou barvou je zobrazena aminokyselina Q₂₃₃ u varianty Hypr5, modrou barvou aminokyselina R₂₃₃ u varianty Hypr50/CB. C, D, E – záměna je zvýrazněna šipkou (Molsoft Browser).



Obrázek 4.3.9: Porovnání struktur proteinu E viru klíšťové encefalitidy. Zelenou barvou je znázorněn protein E u varianty Hypr5, červenou barvou u varianty Hypr50/CB. U části molekuly je zobrazena odpovídajícími barvami i prostorová organizace jednotlivých molekul. Žlutou barvou je zobrazena aminokyselina V₂₇₄ u varianty Hypr5, modrou barvou aminokyselina A₂₇₄ u varianty Hypr50/CB (Molsoft Browser).



Obrázek 4.3.10: 3D modely proteinu E klíšťové encefalitidy. A – zobrazení struktury části proteinu E, varianta Hypr5, červenou barvou je zvýrazněna aminokyselina H₃₉₀; B – zobrazení struktury části proteinu E, varianta Hypr50/V, červenou je zvýrazněna aminokyselina Y₃₉₀; C – zobrazení elektrostatického potenciálu na povrchu dané části proteinu E, varianta Hypr5; D – zobrazení elektrostatického potenciálu na povrchu dané části proteinu E, varianta Hypr50/V (Swiss-PdbViewer).



Obrázek 4.3.11: Porovnání struktur proteinu E viru klišťové encefalidity. Zelenou barvou je znázorněn protein E u varianty Hypr5, červenou barvou u varianty Hypr50/CB. U části molekuly je zobrazena odpovídajícími barvami i prostorová organizace jednotlivých molekul. Žlutou barvou je zobrazena aminokyselina His₃₉₀ u varianty Hypr5, modrou barvou aminokyselina Y₃₉₀ u varianty Hypr50/CB (Molsoft Browser).

5. Diskuze

Tato práce se zabývá problematikou vlivu pasážování viru klíšťové encefalitidy, konkrétně kmene Hypr, v savčích buňkách na nukleotidovou sekvenci genomu viru a posléze aminokyselinovou sekvenci virových proteinů. Podobnými tématy se zabývalo mnoho studií, z nichž ve velké části byl pozorován značný rozdíl ve virulenci v závislosti na druhu hostitele.

Ve studii z roku 1994 bylo prokázáno, že pasážováním viru KE v klíšťeti *I. ricinus* ztrácí virus hemaglutinační aktivitu a snižuje se jeho virulence pro laboratorní myš (Labuda *et al.*, 1994). Další práce dokazují, že několikanásobné reversní pasážování viru KE v savčím hostiteli vede k navrácení virulence pro laboratorní myš (Chunikhin *et al.*, 1986; Dzhivianian *et al.*, 1988; Kaluzová *et al.*, 1994, Romanova *et al.*, 2007).

Romanova a kolektiv (2007) porovnali kmen EK-328 přizpůsobený na myší mozky s variantou, která byla získána pasážováním tohoto viru v klíšťeti *H. marginatum marginatum*. Varianta adaptovaná na klíšťecí buňky se projevovala v kultuře PS (porcine kidney stable – buňky prasečích ledvin) menšími plaky, nepřítomností HA aktivity a pomalejší replikací v prasečích buňkách. Pokud se ovšem tato varianta adaptovaná na klíště repasážovala v savčích buňkách, navrátily se její původní vlastnosti. To podporuje názor, že virus KE se vyskytuje jako heterogenní populace obou variant (přizpůsobené savčím respektive klíšťecím buňkám), což umožňuje rychlou adaptaci viru na změnu hostitele. Zmíněné varianty se lišily v 15 nukleotidech, z nichž 6 způsobovalo záměnu aminokyseliny (Romanova *et al.*, 2007).

Změny ve virulenci může vysvětlit rozdílnost maturace při pasáži v klíšťecích nebo savčích buňkách. Virion replikující se v klíšťecích buňkách se kompletuje v cytoplazmě a získává svůj obal pučením přes cytoplazmatickou membránu, kdežto virion v savčích buňkách pučí do endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu a transportním systémem jsou následně viriony uvolněny z buňky (Šenigl, 2000). Glykosylace povrchového virového proteinu E probíhá obvykle v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu, z čehož plyne, že by změna virulence mohla souviset právě s rozdílnou mírou glykosylace proteinu E.

Mnohé studie však poukazují na to, že virulenci viru ovlivňuje jak kódující část genomu, tak i krátké nekódující sekvence genomu (Pletnev *et al.*, 1993). Mutace v nekódujících úsecích genomu může porušit translaci nebo replikaci virové RNA a tím způsobit atenuaci viru. Kmen Hypr má tento 3'NCR úsek mnohem kratší než prototypový kmen Neudoerfl (Wallner *et al.*, 1995). Tato rozsáhlá delece přitom nijak nesnižovala virulenci pro laboratorní myš, naopak Wallner ve svých pokusech prokázal, že kmen Hypr je mnohem virulentnější než kmen Neudoerfl (Wallner *et al.*, 1996). Překvapivě se ani desítky pasáží viru v délce tohoto úseku

genomu viru neprojevíly; varianty kmenu Hypr se vzájemně v tomto úseku nelišily. Pasážování naopak ovlivnilo 5' NCR, kdy se u varianty Hypr50/V objevila nukleotidová záměna v 13. nukleotidu. Tato záměna však nemá vliv na sekundární strukturu 5' NCR genomu viru.

Největší vliv na virulenci viru se přikládá obalovému proteinu E jakožto hlavnímu strukturálnímu proteinu flavivirů. Tento protein zprostředkovává většinu zásadních funkcí pro infekci hostitelské buňky včetně rozpoznání buněčného receptoru (doména III) a fúze virové membrány s membránou endozomu hostitelské buňky (doména II). Genomy flavivirů (RNA virů obecně) podléhají vysoké frekvenci mutací, dané nepřesností RNA polymerázy a proto mají předpoklad rychle se vyvíjet a měnit (Wallner *et al.*, 1996).

Labuda a kol. porovnávali kmen 4387 a jeho atenuovanou variantu 4387/7. Zkoumali, co způsobuje atenuaci a zjistili, že ztrátu virulence způsobuje změna v unikátním 84. kodonu v aminokyselinové sekvenci proteinu E (konkrétně změna z E na K) (Labuda *et al.*, 1993).

U varianty Hypr50/CB jsem pozorovala tři nukleotidové záměny, které se projeví i v sekvenci aminokyselin. Dvě z nich se nacházejí i u varianty Hypr50/V. Další změna vysocepasážované varianty Hypr50/V v proteinu E se nachází v doméně III, kde se vyskytuje 6 antiaparalelních β -listů, které tvoří dohromady β -soudek. A právě v místě šestého β -listu došlo pasážováním ke změně z H na Y v pozici 390., z polární AMK na nepolární.

V proteinu E varianty Hypr50/CB došlo pasážováním ke změně $D_{67} \rightarrow G_{67}$, která způsobila výraznou ztrátu oblasti se záporným nábojem. Změna $V_{274} \rightarrow A_{274}$ zapříčinila výraznou změnu povrchového potenciálu, došlo k přeskupení okolních AMK a vznikla jednodílná oblast záporného náboje. Tyto změny se nacházely v oblasti první a druhé domény a proto budou mít pravděpodobně vliv na vytváření dimerů a trimerů proteinu E na povrchu virionu. U varianty Hypr50/V se protein E změnil v aminokyselině $K_{55} \rightarrow Q_{55}$. Tato změna měla vliv na uspořádání okolních struktur a náboj na povrchu proteinu E. Dále se změnila AMK $Q_{233} \rightarrow R_{233}$, která vytvořila kladně nabitý výčnělek. Změna v $H_{390} \rightarrow Y_{390}$ měla za následek změnění v oblasti se záporným nábojem. Podobně jako u varianty Hypr50/CB vytvořila záměna v 274. AMK jednodílnou oblast záporného náboje na povrchu proteinu. Tyto substituce mohou ovlivňovat vytváření dimerů a trimerů proteinu E a interakci proteinu E s receptorovými molekulami na povrchu hostitelských buněk.

K dalším změnám došlo také v nestrukturních proteinech viru. V proteinu NS1 se změnilo 2 AMK ve variantě Hypr50/CB a 1 AMK ve variantě Hypr50/V. Tyto změny se nevyskytují v místech, kde dochází ke glykosylaci proteinu ani v místech dvanácti konzervovaných cysteinů, které tvoří disulfidické můstky. Dalo by se uvažovat, zda záměny

AMK neovlivňují sekreci NS1 proteinu z buněk. Nižší sekrece NS1 proteinů by nezpůsobovala tak silnou humorální odpověď a komplement by nelyzoval infikované buňky. Změna v 156. AMK proteinu NS1 z M na V nastala u obou vysoce pasážovaných variant kmenu Hypr.

Ke změnám v proteinech NS2A a NS2B došlo jen u varianty Hypr50/V. NS2A je protein s největší sekvenční variabilitou (Chambers *et al.*, 1990), je součástí replikačního komplexu a hraje roli při skládání virionu (Leung *et al.*, 2008). Záměny AMK jsou v proteinu NS2A velmi časté, oproti kmenu Neudoerfl se Hypr5 liší dokonce v devíti AMK a je možné, že změny ovlivňují replikaci. V proteinu NS2B došlo u varianty Hypr50/V ke dvěma změnám v aminokyselinách (114. a 124. pozice), které se nachází v transmembránové oblasti proteinu NS2B. U obou aminokyselinových substitucí došlo záměnou ke vzniku postranního řetězce s kladným nábojem, který by případně mohl mít vliv na ukotvení NS2B/NS3 v membráně. Změna v membránové oblasti NS2B proteinu by totiž mohla narušit lokalizaci proteázy NS2B/NS3.

V proteinu NS3 došlo u obou vysoce pasážovaných variant kmenu Hypr k substituci v 580. AMK z D na G, tzn. z kyselého polární AMK na neutrální nepolární AMK. Ve variantě Hypr50/CB se vyskytovala záměna v 347. AMK z A na D (z neutrální nepolární AMK na kyselou polární). Wallner a kol. v roce 1996 porovnával tři kmény klíšťové encefalitidy, atenuovaný kmen 263, Hypr a Neudoerfl a došel ke stejnému výsledku. Zajímavé ovšem je, že společná záměna obou vysoce pasážovaných variant v pozici 580. se nachází blízko vysoce konzervované oblasti na karboxylovém konci proteinu NS3 (Benarroch *et al.*, 2004). Tato oblast je zodpovědná za RNA helikázovou, nukleotid-5' trifosfatázovou a RNA-5' trifosfatázovou aktivitu proteinu NS3 (Li *et al.*, 1999). Záměna 580. aminokyseliny mohla tyto aktivity ovlivnit a tím ovlivnit i replikaci virové RNA a viru. V obou proteinech NS4A a NS4B nastaly změny v nukleotidové sekvenci, které ale neměly dopad na změnu aminokyseliny.

V úseku RNA kódujícím protein NS5 došlo k několika nukleotidovým záměnám, přičemž jen jedna způsobuje změnu AMK v 897. pozici z N na R. Tato substituce se nachází u obou variant kmene Hypr50 a nachází se v oblasti katalytické domény RNA-dependentní RNA polymerázy (aminokyselinové zbytky v pozicích 270. – 900.) (Yap *et al.*, 2007). Tato záměna mohla tedy také ovlivnit replikaci viru. 3'NCR konec genomu nebyl pasážováním ovlivněn, ani u jedné z vysoce pasážovaných variant nebyly pozorovány záměny oproti původnější variantě.

V další práci bude potřeba charakterizovat biologické vlastnosti variant Hypr5 a Hypr50/CB, popřípadě dále charakterizovat význam jednotlivých AMK záměn s využitím infekčních cDNA klonů pro replikaci viru a jeho infektivitu.

6. Závěr výsledků:

Porovnála jsem genomové sekvence variant viru klíšťové encefalitidy kmene Hypr a to varianty původní (Hypr5) s variantami, které z ní vznikly následným mnohočetným pasážováním v mozcích sajících myšek na dvou pracovištích – Hypr50/CB a Hypr50/V.

Pasáží viru došlo u Hypr50/CB ke změnám v 8 aminokyselinách, varianta Hypr50/V se liší od původní dokonce ve 13 aminokyselinách. U varianty Hypr50/V došlo také ke změně v 5'NCR úseku, ale tato změna neměla vliv na sekundární strukturu RNA.

Nejvíce záměn v aminokyselinové sekvenci nastalo v proteinu E. Tyto substituce výrazně mění rozložení náboje na povrchu proteinu a mohou tedy ovlivňovat vytváření dimerů a trimerů proteinu E a interakci proteinu E s receptorovými molekulami na povrchu hostitelských buněk.

Záměny u proteinu NS2A, NS3 a NS5 mohou ovlivnit replikaci RNA. V proteinu NS2B varianty Hypr50/V mohou mít změny vliv na jeho proteázovou aktivitu.

Ze zkušeností jiných studií můžeme předpokládat, že se pasážováním v mozcích sajících myší stal virus KE virulentnějším pro laboratorní myš. Námětem další práce by mohlo být praktické testování virulence variant Hypr5 a Hypr50/V, Hypr50/CB na laboratorních myších, které by tyto předpoklady mohlo potvrdit či tuto předpokládanou hypotézu vyloučit. Je pravděpodobné, že mnohonásobným pasážováním došlo ke ztrátě určitých biologických vlastností, které jsou vlastní kmenům KE cirkulujícím v přírodě.

Význam zjištěných nukleotidových a aminokyselinových záměn pro virulenci viru budeme dál zkoumat.

7. Seznam použitých zkratk

AMK	aminokyselina
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
KE	klíšťová encefalitida
NCR, UTR	nekódující část genomu
NS	nestrukturní protein
nt	nukleotid
ORF	otevřený čtecí rámec
PCR	polymerázová řetězová reakce
RT	reverzní transkripce
TAE	pufr Tris-acetát-EDTA

8. Přehled použité literatury:

- **Allison SL**, Stadler K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. *J Virol* **1995**, 69:5816–20.
- **Arias C**, Preugschat F, Strauss JH. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology* **1993**, 193: 888-899.
- **Avsic-Zupanc T**, Poljak M, Maticic M, Radsel-Medvescek A, LeDuc JW, Stiasny K. Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains. *Clin Diagn Virol* **1995**, 4:51–9.
- **Bazan JF**, Fletterick RJ. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* **1989**, 171: 637-639.
- **Bednar B**. Tick-borne encephalitis with a protracted course. In: Bogaert van L, *et al.*, editors. *Encephalitides*. Amsterdam: Elsevier **1961**, 17–22.
- **Benarroch D**, Selisko B, Locatelli GA, Maga G, Romette J-L, Canard B. The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg²⁺-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology* **2004**, 208–218.
- **Birulya NB**, Zalutskaya LI. Warming of the climate and outbreaks of tickborne encephalitis. *Med Parazitol* **1965**, 3:65–7.
- **Blaskovich D**. Tick-borne encephalitis in Czechoslovakia. *Arch Environ Health* **1970**, 21:453–61.
- **Brandt WE**, Cardiff RD, Russell PK. Dengue virions and antigens in brain and serum of infected mice. *J Virol* **1970**, 6: 500 – 506.
- **Burke DS**, Monath TP. Flaviviruses. In: David M, Knipe PMH, editors. *Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; **2001**, 1043–125.
- **Combet C**, Jambor M, Deléage G, Geourjon C. Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein, *Bioinformatics* **2002**, 18(1): 213-214.
- **Crooks AJ**, Lee JM, Easterbrook LM., Timofeev AV, Stephenson JR. The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the cell. *J Gen Virol* **1994**, 75: 3453-3460.
- **Debashish R**, Shi P-Y. Recent advances in flavivirus antiviral drug discovery and valine development. *Recent Patents Anti-infect Drug Disc* **2006**. 1: 45 – 55.
- **Dumpis U**, Crook D, Oksi J. Tick-borne encephalitis. *Clinical Infect Dis* **1999**, 28: 882-890.

- **Dzhivanian TI**, Korolev MB, Karganova GG, Lisak VM, Kashtanova GM, Chuprinskaya MV. Changes in the host-dependent characteristics of the tick-borne encephalitis virus during its adaptation to ticks and its readaptation to white mice. *Vopr Virusol* **1988**, 33: 589–595.
- **Elshuber S**, Allison SL, Heinz FX, Mandl CW. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol* 2003, 84: 183 – 191
- **Ferlenghi I**, Clarke M, Ruttan T, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Molecular organization of a recombinant subviral particle from tick-borne encephalitis virus. *Mol Cell* **2001**, 7: 593–602.
- **Fingerland A**, Vortel V. Tick encephalitis. In: Bogaert van L, et al., editors. *Encephalitides*. Amsterdam: Elsevier **1961**, 23–32.
- **Falgout B**, Miller RH, Lai CJ. Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. *J Virol* **1993**, 67: 2034 – 2042.
- **Gorbalenya AE**, Donchenko AP, Blinov VM, Koonin EV. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res* **1989**, 17: 3889 – 3897.
- **Grešiková M**, Bakoss P. Kliešťová encefalitída – trvalý verejno-zdravotnícky problém. Bratislava : Veda, vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied. **1999**, ISBN 80-224-0627-9 ISBN 978-80-224-0627-7.
- **Grinschgl W**, Kovac W, Seitelberger F. Spring–summer–encefalomyelitis in Austria. In: Bogaert van L, et al., editors. *Encephalitides*. Amsterdam: Elsevier. **1961**, p. 3–16.
- **Gritsun TS**, Venugopal K, Zanutto PM, Mikhailov MV, Sall AA, Holmes EC. Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5- and 3- UTRs. *Virus Res* **1997**, 49: 27–39.
- **Gritsun TS**, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res* **2003**, 57: 129-146.
- **Guex N**, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* **1997**, 18: 2714-2723 www.expasy.org/spdbv.
- **Guirakhoo F**, Heinz FX, Mandl CW, Holzmann H, Kunz C. Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. *J Gen Virol* **1991**, 72: 1323– 1329.
- **Gustavson R**, Forsgren M, Gardulf A, Granstrom M, Svenungsson B. Clinical manifestations and antibody prevalence of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis

in Sweden: a study in five endemic areas close to Stockholm. *Scand J Infect Dis* **1993**, 25:595–603.

- **Günther G**, Tick-borne encephalitis on pathogenesis and prognosis. Thesis Karolinska Institute **1997**.
- **Haglund M**, Forsgren M, Lindh G, Lindquist L. A 10-year follow-up study of tick-borne encephalitis in the Stockholm area and a review of the literature: need for vaccination strategy. *Scand J Infect Dis* **1996**, 28: 217-24.
- **Hall TA**, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **1999**, 41: 95-98.
- **Heinz FX**, Allison SL, Stiasny K, Schalich J, Holzmann H, Mandl CW. Recombinant and virion-derived soluble and particulate immunogens for vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine* **1995**, 13: 1636–42.
- **Heinz FX**, Allison SL. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr Opin Microbiol* **2001**, 4: 450-455.
- **Heinz FX**, Allison SL. Flavivirus structure and membrane fusion. *Adv Virus Res* **2003**, 59: 63-97.
- **Helenius A**. Alphavirus and flavivirus glycoproteins: structures and functions. *Cell* **1995**, 81: 651-653.
- **Henchal EA**, Henchal LS, Schlesinger JJ. Synergistic interactions of anti-ns1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J Gen Virol* **1988**, 69: 2101-2107
- **Hennig L**. WinGene/WinPep: User-friendly software for the analysis of aminoacid sequences. *BioTechniques* **1999**, 26: 1170-1172.
- **Holzmann H**, Stiasny K, York H, Dorner F, Kunz C, Heiz FX. Tick-borne encephalitis virus envelope protein E-specific monoclonal antibodies for the study of low pH-induced conformational changes and immature virions. *Arch Virol* **1995**, 140: 213-221.
- **Hurrelbrink RJ**, McMinn PC. Molecular determinants of virulence: the structural and functional basis for flavivirus attenuation. *Adv Virus Res* **2003**, 60: 1-42.
- **Chambers TJ**, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* **1990**, 44: 649-688.
- **Chambers TJ**, Nestorowicz A, Amberg SM, Rice CM. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *J Virol* **1993**, 67: 6797-6807.
- **Chang HH**, Shyu HF, Wang YM, Sun DS, Shyu RH, Tang SS, Huang YS. Facilitation of cell adhesion by immobilized dengue viral nonstructural protein 1 (NS1): arginin-

glycine-aspartic acid structural mimicry within the dengue viral NS1 antigen. *J Infect Dis* **2002**, 186: 743-751.

- **Chunikhin SP**, Stefuktina LF, Korolev MB, Reshetnikov IA, Khozinskaia GA. Sexual transmission of the tick-borne encephalitis virus in ixodid ticks. *Parazitologiya* **1983**, 17: 214–217
- **Chunikhin SP**, Reshetnikov IN, Liapustin VN. Variability of tick-borne encephalitis virus during passage through Ixodes ticks and small mammals. *Med. Parazitol* **1986**, 6: 58 – 61.
- **Chunikhin SP**. Tick-borne encephalitis. *Med Parazitol* **1991**, 3: 52–54.
- **Kaluzová M**, Elečková E, Žuffová E, Pastorek J, Kaluz Š, Kouch O, Labuda M. Reverted virulence of attenuated tick-borne encephalitis virus mutant is not accompanied with the changes in deduced viral envelope protein amino acid sequence. *Acta Virol* **1994**, 38: 133–140.
- **Kanter VM**. Clinical forms of the acute stage of tick-borne encefalitis. *Klin Med* **1965**, 43: 111–117.
- **Kofler RM**, Heinz FX, Mandl CW. Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favourable target for attenuation of virulence. *J Virol* **2002**, 76: 3534-3543.
- **Koonin EV**, Dolja VV. Evolution and taxonomy of positive strand RNA viruses : implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **1993**, 28: 375– 430.
- **Kopecký, J.**, Tomková E, Vlček M. Immune response of the long-tailed field mouse (*Apodemus sylvaticus*) to tick-borne encephalitis virus infection. *Folia Parasitologica* **1991**, 38: 275 – 282.
- **Labuda M**, Danielová V, Jones LD, Nuttall PA. Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during co-feeding of ticks. *Med Vet Entomol* **1993**, 7: 339-342.
- **Labuda M**, Jiang WR, Kaluzová M, Kouch O, Nuttall PA, Weismann P, Elečková E, Žuffová E, Gould EA. Change in phenotype of tickborne encephalitis virus following passage in *Ixodes ricinus* ticks and associated amino acid substitution in the envelope protein. *Virus Res* **1994**, 31: 305–315.
- **Labuda M**, Kožuch O, Žuffová E, Elečková E, Hails RS, Nuttall PA. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural hosts. *Virology* **1997**, 235: 138-143.

- **Leung JY**, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. The role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J Virol* **2008**, doi:10.1128/JVI.00002-08.
- **Li H**, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol* **1999**, 73: 3108–3116.
- **Lindenbach BD**, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol* **1999**, 73: 4611 – 4621.
- **Lindenbach BD**, Charles MR. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: David M, Knipe PMH, editors. *Virology* **2001**, 991–1041.
- **Lindenbach BD**, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* **2003**, 59: 23–61.
- **Lorenz IC**, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol* **2002**, 76: 5480-5491.
- **Málková D**, Kolman JM. Role of the regional lymphatic system of the immunized mouse in penetration of the tick-borne encephalitis virus into the blood stream. *Acta Virol* **1964**, 8: 10-13.
- **Mandl CW**, Holzmann H, Meixner T, Rauscher S, Stradler PF, Allison SL, Heinz FX. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of flavivirus. *J Virol* **1998**, 72: 2132-2140.
- **Mandl CW**, Allison SL, Holzmann H, Meixner T, Heinz FX. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of putative flavivirus receptor binding site. *J Virol* **2000**, 74: 9601-9609.
- **Mandl CW**. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res* **2005**, 111: 161 – 174
- **McMinn PC**. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *J Gen Virol* **1997**, 78: 2711-2722.
- **Mukherjee M**, Dutta K, White MA, Cowburn D, Fox RO. NMR solution structure and backbone dynamics of domain III of the E protein of tick-borne Langat flavivirus suggests a potential site for molecular recognition. *Protein Sci* **2006**, 15: 1342-135
- **Muylaert IR**, Chambers TJ, Galler R, Rice CM. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence. *Virology* **1996**, 222: 159-168.

- **Nowak T**, Wengler G. Analysis of disulphides present in the membrane proteins of West Nile flavivirus. *Virology* **1987**, 156: 127-137.
- **Okulova NM**, Chunikhin SP, Vavilova VE, Maiorova AD. The location of the infecting tick-bite and the severity of the course of tick-borne encephalitis. *Med Parazitol* **1989**, 5: 78–85.
- **Pavlovsky EN**. Ticks and tick-borne encephalitis. *Parazitologia Dalnego Vostoka Leningrad* **1947**, 5: 212–64.
- **Pletnev AG**, Bray M, Lai CJ. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. *J Virol* **1993**, 67: 4956-4963.
- **Pospíšil L**, Jandásek L, Pešek J. Isolation of new strains of tick-borne encephalitis virus, Brno region, summer 1953, *Lékařské listy* **1954**, 9: 3 – 5.
- **Puchhammer-Stöckl E**, Kunz C, Mandl CW, Heinz FX. Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clin Diagn Virol* **1995**, 4(5): 321–6.
- **Pugachev KV**, Guirakhoo F, Trent DW, Monath TP. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. *J Parasitol* **2003**, 33: 567-582.
- **Rauscher S**, Flamm C, Mandl CW, Heinz FX, Stadler PF. Secondary structure of the 3'-noncoding region of flavivirus genomes: comparative analysis of base pairing probabilities. *RNA* **1997**, 3: 779-791.
- **Rey FX**, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* **1995**, 375: 291- 298.
- **Romanova IL**, Gmyl' LV, Loktev VB, Protopopova EV, Dzhivianian TI, Lashkevich VA, Karganova GG. Change in the antigenic structure of surface glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus during its adaptation to ticks and mammals, *Vopr Virusol* **2006**, 51: 31-34.
- **Romanova IL**, Gmy PA, Dzhivianian IT, Bakhmutov VD, Lukashev NA, Gmyl VL, Romyantsev AA, Burenkova AL, Lashevich AV, Karganova GG. Microevolution of the tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology* **2007**, 362: 75 – 84.
- **Ryan K**. Advantages and challenges of using inclusive evaluation approaches in evaluation practise. *Am J Eval* **1998**, 19: 101 – 122.
- **Růžek D**, Gritsun TS, Forrester NL, Gould EA, Golovchenko M, Rudenko M, Grubhoffer L. Mutations in the NS2B and NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a Western European field strain of tickborne encephalitis virus, *Virology* **2008**, doi:10.1016/j.virol.2008.01.010.

- **Schalich J**, Allison SL, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. *J Virol* **1996**, 70: 4549–57.
- **Schneider H**. Über epidemische akute “Meningitis serosa.” *Wiener Klin Wschr* **1931**, 44: 350–352.
- **Smorodintsev A**. Tick-borne spring-summer encephalitis. *Progr Med Virol* **1958**, 1: 210–248.
- **Stadler K**, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* **1997**, 71: 8475–8481.
- **Steffens S**, Thiel HJ, Behrens SE. The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit simile properties in vitro. *J Gen Virol* **1999**, 80: 2583-2590.
- **Stiasny K**, Bressanelli S, Lepault J, Rey FA, Heinz FX. Characterization of a membrane-associated trimeric low-pH-induced form of the class II viral fusion protein E from tick-borne encephalitis virus and its crystallization. *J Virol* **2004**, 78: 3178–3183.
- **Šenigl F**. Maturation of tick-borne encephalitis virus in tick and mammalian cells. Proceedings of the 3rd International Conference “Ticks and Tick-borne Pathogens: Into the 21st Century“. Bratislava **2000**, 29-37.
- **Vingre I**, Nesaule V, Kalvelis G. Tick-borne encefalitis. Riga, Latvia: Zvaigzne **1984**, 30–84.
- **Wallner G**, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. *Virology* **1995**, 20(213): 169–78.
- **Wallner G**, Mandl CW, Ecker M, Holzmann H, Stiasny K, Kunz C, Heinz FX. Characterization and complete genome sequences of high- and low- virulence of tick-borne encephalitis. *J Gen Virol* **1996**, 77: 1035 – 1042.
- **Winkler G**, Heinz FX, Kunz C. Studies on the glycosylation of flavivirus E proteins and the role of carbohydrate in antigenic structure; *Virology* **1987**, 159: 237-243.
- **Yap TL**, Xu T, Chen Y-L, Malet H, Egloff M-P, Canard B, Vasudevan SG, Lescar J. Crystal Structure of the Dengue Virus RNA-Dependent RNAPolymerase Catalytic Domain at 1.85-Angstrom Resolution. *J Virol* **2007**, 4753–4765.
- **Zheng D**, Aramini JM, Montelione GT. Validation of helical tilt angles in the solution NMR structure of the Z domain of Staphylococcal protein A by combined analysis of residual dipolar coupling and NOE data. *Protein Sci* **2004**, 13: 549–554.
- **Zilber LA**. Spring-summer tick-borne encephalitis. *Arkhiv Biol Nauk* **1939**, 56: 255–61.

- **Zuker M.** The use of dynamic programming algorithms in RNA secondary structure prediction. In: Waterman MS, editor. *Mathematical Methods for DNA Sequences*. Boca Raton, FL: CRC Press **1989**, p. 159-184.

9. Přílohy

Příloha 9.1 Kompletní genomová sekvence kmenu Hypr5 klíš'ové encefalidity

1 agattttctt gcacgtgctg cggtttgctt cggacagcat tagcagcggg ttggttgaaa
61 gaaatattct tttgttttta ccagtcgtga acgtgttgag aaaaagacag cttaggagaa
121 caagagctgg g gatggcaaa gaagccatc ctgaaagga aggggggagg tccccctga
181 cgagtgtcga aagagaccgc aacgaagacg cgtcaacca gagtccaaat gccaaatggg
241 ctcgtgttga tgcgcatgat ggggatcttg tggcatgccg tagctggcac cgcgagaac
301 cccgtattga aggcgttctg gaactcagtc cctctgaaac aggccacagc agcactgagg
361 aagatcaaaa ggacagtgag tgcctaata gttggcttgc aaaaacgcgg gaaaaggagg
421 tcagcgacgg actggatgag ctggttgcta gtcattactc tgttggggat gacgattgct
481 gcaaccgtga gaaagaaaag ggacggctca actgtgatca gagtgaagg aaaggacgca
541 gcaactcagg tgcgtgtgga gaatggcacc tgtgtgatcc tggctactga catggggctca
601 tgggtgtgatg attcactgtc ctatgagtgt gtgacatag atcaaggaga agagcctggt
661 gacgtggatt gttttgccc gaattgtgat ggagtctatc tggagtatgg acgctgtggg
721 aaacaggaag gctcacggac aaggcgtca gtgtgatcc catcccatgc ccaggagag
781 ctgacgggga ggggacacaa atggctagaa ggagactgc tgcgaacaca tctaccaga
841 gttgagggat gggtttgaa gaacaggcta ctgccctgg cgatggctac cgtgtgtgg
901 ttgacctgag agagtgtgtt gaccagggtc gccgttctgg ttgtgctct gtgtttggc
961 ccggtctacg ctctcgctt cacacattg gaaaacaggg actttgtgac tggactcag
1021 gggactacga gggcacctt ggtgctgaa ctgggtgat gtgttaccat aacagctgag
1081 ggaagcctt caatgatgt gtgcttgc gccattacc aggagaacc tgctaagaca
1141 cgtgagtact gtttacacgc caagtgtcg gacactaagg ttgacgtag atgccaaca
1201 atgggaccag ccactttggc tgaagaacac cagggtggca cagtgtgcaa gagagatcag
1261 agtgatcag gctgggcaa cactgtgga cttttgaa agggtagcat tgtggcctgt
1321 gtcaaggcgg ctgtgaggc aaaaaagaaa gccacaggac atgtgtacga cgcaacaaa
1381 atagtgtaca cggtaaaagt cgaaccacac acgggagact atgttccgc aaacgagaca
1441 catagtggga ggaagacggc atccttca gtttctcag agaaaacat tctgactatg
1501 ggtgagtatg gagatgtgtc tctgtgtgt agggctgcta gtggcgttga ctggcccag
1561 accgtatcc ttgacttga caagacagtg gaacacctc caacggctt gacggtccac
1621 agggactggt ttaatgatct ggctctgcca tggaaacatg agggagcgc aaactggaat
1681 aacgcagaaa gattggttga atttggggct cctcatgctg tcaagatgga tgtgtacaac
1741 ctggagacc agactggagt gttactgaag gctctcctg gggttcctgt ggtacacatt
1801 gaggaacca agtaccacct gaagagtggc catgtgacct gcgaagtgg actggaaaa
1861 ctgaagatga aaggtctac gtacacaatg tgtgacaaa caaagttcac atggaagaga
1921 gctccaacag acagtggca tgatacagtg gtcattgaa tcacatttc tgaacaaag
1981 ccctgtagga tcccagcaac ggcagtggca catgatctc cagatgtgaa cgtggccatg
2041 ctgatacgc caaaccaac aattgaaaac aatggagggt gcttcataga gatgacgctg
2101 ccccagggg acaacatcat ctatgttggg gaactgagtc atcaatggt ccaaaaagg
2161 agtagatcg gaagatgtt ccaaaagacc aagaaggca tagaaagact gacagtgata
2221 ggggagcag cctgggactt cggttctgct ggaggcttc tgagtcaat tgggaaggc
2281 gtgcacacgg tccttgggtg tctttcaac agcatcttcg ggggagtgg gtttctacca
2341 aagcttctat taggagtggc attggcttgg ttggcctga acatgagaaa ccctacaatg
2401 tccatgagct tctcttggc tggaggtctg gttttggcca tgaccctgg agtggggcg
2461 gatgttggct gcgctgtgga cacggaacga atggagctc gctgtggcga aggcctggtc
2521 gtgtggagag aggtctcaga atggtatgac aactatgct actaccgga gacaccggg
2581 gcccttgcag cagcataaaa ggagacattt gaggaggga gctgtggcgt agtccccaa
2641 aacaggctcg agatggccat gtggagaagc tcggtcacag agctgaatct ggctctggc
2701 gaaggtgagg caaatctac agttaggtg gacaagttg acccactga ctaccgaggt
2761 ggtgtcctg gttactgaa aaaaggaaag gacataaaag tctcctggaa aagctgggg
2821 cattcaatga tctggagcat tctgaggcc cccctgctc tcatggtggg cacggaagg
2881 caaagtgagt gtcccctgga gagacggaag acaggtgtt tcacggtggc agaattcgg
2941 attggcctga gaacaaagg ctcttggat ttacagacagg aaccaacaca tgagtgtgac
3001 acaggagtga tgggagctgc cgtcaagaac ggcatggcaa tccacacaga tcaaagtct
3061 tggatgagat caatgaaaa tgacacaggc acttacatag tgaactttt ggtcactgac
3121 ctgaggaact gctcatggcc tgtagccac actatcgata atgctgacgt ggtggactc

3181 gagttattcc ttccggcgag cttggcagga cctagatcct ggtacaacag gatacccgg
3241 tattcagaac aggtgaaggg gccatggaag cacacgccta tccgagtcag cagagaggag
3301 tgtcccggca cgaccgttac catcaacgcc aagtgtgaca aaaggaggag atctgtgagg
3361 agtaccacag agagtggcaa ggttatccca gaatgggtgct gccgagcgtg cacaatgcc
3421 ccagtgcgt tccggactgg aactgattgc tggtatgcca tggaaatacg gccagtccat
3481 gaccaggggg ggcttgttcg ctcaatggtg gttgcggaca acggtgaatt actcagtga
3541 ggaggggtcc ccggaatagt ggcattgttt gtggtccttg aatacatcat ccgagggaga
3601 cctccacgg gatcaacgg tgtgtggggg gccatcgtc ttctcgctt gctgtcacc
3661 gggatggta ggatggagag cctggtgctg tatgtgtgg cagtgggat cacattccac
3721 ctgagctag ggccagagat cgtggccttg atgctactc aggtgtgtt tgagctgagg
3781 gtgggttgc tcagcgcatt tgcgtgctc agaagcctca ccgtccgaga gatggtgacc
3841 acctacttc tttgtctgt cctggaattg gggctgccga gtgcgaacct tgaggattc
3901 tggaaatgg gtgatgcact ggccatgggg gcgctgat ttagggcttg cacggcagaa
3961 ggaaagact gacggggct cctgctcatg gctctcatga cacagcagga tgtgtgact
4021 gtcatcatg gatgggtg cttcctgagt gcagcttcgg cttgctcgt ctggaggctg
4081 ctgaggggac acagagagca gaaggattg acctggattg tccccctgg tagattgctt
4141 gggggagagg gctctggaat cagactgctg gcgttttgg agctgtcagc tcacagagga
4201 agacgatctt tcagtgaacc actaactgtg gtaggggtca tgctgacatt ggctagcggc
4261 atgatgcgac acacctccca ggaggctctc tgtgactcag cagtggctc gtttcttg
4321 ttgatctgg tgctggggac aagaaagatg cagctggtt ccgaatggag tggctgtgtg
4381 gaatggcat cggaactagt gaatgaggg ggagaggtta gctgcgggt ccgtcaggac
4441 gcgatgggaa accttactt gactgagctc gagaaagaag agagaatgat ggcttttgg
4501 ttgattgcc gcttggcagc ttagccatt cattggtcag gcattcttg tgtatggga
4561 ctgtggcgc tcacggaaat gctgaggta tcccgaagg ctgacctgt tttcttgg
4621 caggggggtc gagagcgtg tgacagacct ttcgaggtta aggacgtgt ctacaggatt
4681 tcagccccg cttgttctg ggtcagaac caggtggag ttggctacgg ttccaaggt
4741 gtcttcaca cgatgtggca tgtgacgaga ggagcggcgc tgtctattga tgatctgtg
4801 gccgtccct actgggctg tgtgaggag gatgtgtgt gctacggagg agcctggagt
4861 ctggaggaaa aatggaaagg tgaacagta caggttcag ccttccacc aggaagggc
4921 catgaggtg atcagtcca gcctggggag ttgatcctg acaccggaag gaagcttgg
4981 gcaatacaa ttgatttgg aaaaggaaca tcaggcagcc ccattctaa cggccagga
5041 gtgtctgtg ggctatacgg aatggccta aagaccaatg agacctacgt cagcagcatt
5101 gctcaaggg aagcggagaa gactcgacc aacctccac aggtgtgtt gggcacggg
5161 tggacatcaa aggtcagat cacagtgtg gacatgcacc caggtcagg gaagaccac
5221 agagtctcc cggagctcat tcgcaatgc attgacagg gcctgagaac gttgtgtt
5281 gctccaact gtgtgtact caaagaaatg gagcgcct tgaatggaa acgggtcagg
5341 ttccactcac cagcagtcag tgaccaacag gctggaggg caattgtcga tgtatgtg
5401 cacgcaact atgtcaacag acggctacta ccacagggga gacaaaatt ggaggtggca
5461 atcatggat aggccactg gactgacct cacagcatag ctgccagagg tcattgtac
5521 actctggcaa aagaaaaca gtgtgactg gctttagta cagcagacc tcctgtaag
5581 agtgaacct ttcggagt taacggagc atcagtagt aggaagaca gattcctaat
5641 ggagagtg gtgacgggt tgcaggatc actgagtagt aaggacgcac agcctggtt
5701 gtccctcga ttgcaaaagg tgggtctata gctgcacct tgagacagaa aggaaaagt
5761 gtgatctgt tgaacagca aaccttgaa aaggactact caagagttag gtagagaag
5821 cctgactttg tggtagcagc tgatatctg gagatggag ccaacctga cgtgagccg
5881 gcatagatg ggaggacaaa catcaagcct gaggaggtt atgggaagg cgagctacc
5941 gggaccaggc gactgaccac ggctccgct gcccaacggc gcggaagagt tggcggca
6001 gacggacgaa cagatgaata catatactt ggacagtgt atgatgatga cagtggatta
6061 gtgcaatgga aggagcgc aatacttct gacaacata caaccttgc ggggccgtg
6121 gccaccttt atggaccaga acaggacaag atgccggagg tggccgtca cttcagctc
6181 actgaagaga aaagaaagca ctccgacat cttctactc atgtgactt tacaccgtg
6241 ctggcgtgg acgtcgcagc gaatgtgct agcgtcacg atcgaagct gacatgggaa
6301 gggccggagg caaatgccg gatgagggc agtggtagt tggcacctt caggagccc
6361 aatggggcgg agagaactc caggccgtg tgaaggacg cacgcatgt caagagggga
6421 cgtgacatca aagagttcgt ggcgtacgca tctggcgtc gcagtttcg agatgtctg
6481 acaggaatg cggagttcc ggagctttg cggcacagat gcgtcagtc cctggacgtc
6541 ttctacacac tcatgatga gaaacctgac agcagggcaa tgagaatggc ggagagagc
6601 gcccagagg ctttctgac catggttag atgatggtg tgggttggc aacctgggt
6661 gcatctgtg gttcgtcgt ccggacttca atcagccgta tgatgctgg cacgctgtc

6721 ctgctggcct ctttctact cttgtgggca ggtggcgtcg gctatgggaa tatggccgga
6781 gtggccctca tcttctacac gttgctgacg gtgctgcagc ccgagggcggg aaaacagaga
6841 agcagtgatg acaacaaact ggcatatfff ttgctgacgc tctgcagcct tgctggactg
6901 gttgcagcca atgagatggg ttttctggag aagaccaagg cagactgtc cacggtgctg
6961 tggagtgaac gggaggaacc ccggccatgg agtgaatgga cgaatgtgga catccagcca
7021 gcgaggtcct gggggaccta tgtgctggtg gtgtctctgt tcacacctta catcatccac
7081 caactgcaga ccaaaatcca acaactgtc aacagtgcg tggcatctg tgcacaggcc
7141 atgagagacc ttgggggagg tgccccctc tttggtgtg cgggacatg catgaccctc
7201 ggggtggtg cactgattg ggctactccc acctattga tggggcgtg tggcctggcg
7261 gcactccatc tggccattg ggtgtctggt ctggaggctg aattgacaca gagagctcat
7321 aaggtctfff tctctgcaat ggtgcgcaac cccatggtg atgggatgt catcaacca
7381 ttcggggagg gggaggcaaa acctgctcta tatgaaagga gaatgagtct ggtgctggcc
7441 atagtgtgt gcctcatg acctgctatg aaccgaacg tggcctccat aacagaggct
7501 tcagctgtg gactggcagc agcgggacag ctgctcaggc cggaggctga cacactgtg
7561 acgatgccgg ttgctgtg catgagtgt gtgctcagg gtagcctgtg ggggtttctc
7621 cctctgggc atagactctg gcttcgagct tctggggta ggcgtggtg ttctgagga
7681 gacacgctg gagatctctg gaaacggagg ctgaacaact gcaccagga ggaattctt
7741 gtgtacagg cactggcat cctggagacg gaacgtgaca aggctagaga gttgctcaga
7801 agaggagaga ccaatatggg attggctgtc tctcggggc cggcaaagct tgcctggctc
7861 gaggaacgcg gatatgccac cctcaagga gaggtgtag atcttgatg tgaagggg
7921 ggctgtcct attatgcggc atcccagcc gcagtcatga gtgctcaggc atacaccatt
7981 ggtggaagag gcatgaggc tccaaagatg gtaacaagcc tgggttgaa cttgatcaa
8041 tttagatcag gaatggacgt gttcagcatg cagccacacc gggctgacac tgcattgt
8101 gacatcggag agagcagccc agatgccgt gtggagggtg agaggacaag gaaagtata
8161 ttgctatgg agcaatgaa aacaggaac cccacggctg cctgtgtgt caagtgctg
8221 gcccatacc gccagaagt gatagaagca ctgcacagat tccactgca atggggggg
8281 ggtctgtgga ggacccttt ttcaaggaac tccacctatg agatgtatta ctcaacagct
8341 gctactgga acatagtga ctcgtcaat gtacagtcga gaaactfff gctcgtgtt
8401 ggagaccaga gaggccaac cagggtgcct gaactgacc tgggagttg aacgaggtg
8461 gtggtcttag ctgaggaca ggtgaaagaa caagatgtac aagagaggat caaagcgtg
8521 cgggagcaat acagcgaac ctggcacatg gacgaggaac atccgtaccg gacatggcag
8581 tattgggca gctaccgcac ggcaccaacc ggctcggcgg cgtcactgat caatggggt
8641 gtgaaactc tcagctggc atggaacgca cgggaagatg tggtcgcat ggccatgact
8701 gacacaacg ctttcggaca gcagagatg ttcaaagata aagttgacac aaaggcagc
8761 gaacctcag ccggcacaag agtcatcatg agagcagtaa atgattgat tttggaacga
8821 ctggcgaga aaagcaaac gcgtatgtg agcagagagg aattcatagc aaaagtga
8881 tcaaacgag ctttgggagc ttgctcagat gagcaaaaca gatggcgag tgaagagag
8941 gctgtagagg atctgcatt ctggcacctc gtggtgaag agagagaaag gcacctcatg
9001 gggagatcg cgcactcgt gtacaacatg atggcaaga gagagaagaa actgggagag
9061 ttcggagtg cgaagggaag tggggcatt tggatcatg gctggggag tgcctttctg
9121 gatttcgagg ctcttgatt cttgaatgaa gaccattgg cctctagaga gtccagtga
9181 gctggagtg aggaataag ttgaaactac ctggcctgg acctcaagaa gttgtcaacc
9241 ctgaaatgga gactcttcta tgcagatgac acagctggct gggacacgaa agttaccaat
9301 gcagacttag aggatgaaga acagatccta cggatcatg agggtagca caaacaactg
9361 gcaaccacaa taatgcaaaa agcatatcat gccaaagtgc tgaaggctgc gaggccctc
9421 cgtgatggag gctgcatcat ggtgtcatc acaagaagag atcaaagagg ttcggccag
9481 gttgtgacct atgccctta caccctcacc aacataaagg tgcaactaat ccgaatgatg
9541 gaaggggaag gggctataga ggcagcggat gcacacaacc cgagactgct tgcagtggag
9601 cgctggctg aagaacatg agaagagcgt cttggaagaa tgcctgctcag tggtagcat
9661 tgtgtggtg ggccttggg tgacagatg gcaaaagc tttactttct gaatgacatg
9721 gcaagacca ggaaggacat tggggaatg gacactcgg ccggcttatc aagctgggag
9781 gaggccctt tttgttca ccactccac gagctagtga tgaaggacg acgcacctg
9841 gtggtgccg gcagagacca agatgaactc gttgggagg cgcgcatctc accgggatg
9901 ggctggagt tccgcgagac ggcctgcct tcaaaagcct acgggcagat gtgctgctg
9961 agctactcc atcggcgaga cctgaggacg ctgggctt ccatcaactc agcagtgcct
10021 gtcattggg ttctaccgg ccgcacgaca tggagcatc atgccagtg ggcctgatg
10081 accacagaag acatgctgga cgtctggaac cgggtgtgga tttggaca cccttcatg
10141 cagaacaagg gaaaggtcat ggagtggagg gatgtccgt acctccctaa agctcaggac
10201 atgttatgtt cctccctcgt tgggagga gaaagagcag aatgggcaa gaacatctg

10261 ggagcagtgg aaaaggtgag gaagatgata gggcctgaaa agttcaagga ctatctctct
 10321 tgtatggacc gccatgacct gactggggag ctgaacctgg agagctcaat aatctaaacc
 10381 cagactgtga cagagcaaaa cccggagggc tcgtaaaaga ttgtccggaa ccaaaagaaa
 10441 agcaagcaac tcacagagtg tgagaccccc ctgaccagca aaggggcaga tgggtcaggg
 10501 gtgagggatg cccccagagt gcattacggc agcagccag tgagagtggc gacgggaaaa
 10561 tggtcgatcc gcagctaggg cactctgaaa aactttgtga gaccccctgc atcatgataa
 10621 ggccgaacat ggtgatgaa aagggaggcc cccggaagta cgcttccggg aggaggggag
 10681 agagaaattg gcagctctct tcaggatfff tctcctctct atacaaaatt ccccctcgg
 10741 agaggggggg cggttctgt tctccctgag ccaccatcac ccagacacag atagtctgac
 10801 aaggaggtga tgtgtgactc ggaaaaaac cggct

Podtržení značí změnu nukleotidu Hypr5 oproti variantě Hypr50/V

Příloha 9.2 Kompletní genomová sekvence kmenu Hypr klíš'ové encefalitidy

1 agattttctt gcgctgctg gcgtttgctt cggacagcat tagcagcggg tggtttga
 61 gaaatattct tttgtttta ccagtcgtga acgtgttgag aaaaagacag cttaggagaa
 121 caagagctgg gtaggtcaa gaaggccatc ctgaaagga agggggggcg tccccctcga
 181 cgagtgtcga aagagaccgc aacgaagacg ctgaaccca gagtccaaat gccaaatggg
 241 ctggtgttga tgcgatgat ggggatcttg tggcatgcc tagctggcac cgcgagaaac
 301 cccgtattga aggcgttctg gaactcagtc cctctgaaac aggccacagc agcactgagg
 361 aagatcaaaa ggacagtgag tgcctaata gttggcttg aaaaacgagg aaaaaggagg
 421 tcagcgacgg actggatgag ctggttgcta gtcattactc tgttgggat gacgattgct
 481 gcaaccgtga gaaagaaa ggacggctca actgtgatca gagctgaagg aaaggacgca
 541 gcaactcagg tgcgttggga gaatggcacc tgtgtgatcc tggctactga catgggggta
 601 tgggtgatg atcactgtc ctatgagtgt gtgacctat atcaaggaga agagcctggt
 661 gacgtggatt gtttttggc gaattgtgag ggagtctatc tggagtatgg acgctgtggg
 721 aaacaggaag gctcacgac aagcgctca gtgctgatcc catccatgc ccagggagag
 781 ctgacgggga ggggacaca atggctgaa ggagactgc tgcgaacaca tctcaccaga
 841 gttgagggat gggtttggaa gaacaggcta cttgccctgg cgatggctac cgttgtgtg
 901 ttgacctgg agagtgtgt gaccagggc gccgttctgg ttgtgctct gtgtttggc
 961 ccggtctacg cttcgcgtt cacacattg gaaaacagg actttgtgac tggactcag
 1021 gggactacga gggcacctt ggtgctgaa ctgggtggat ggttaccat aacagctgag
 1081 ggaagcctt caatggatgt gtgcttgac gccattacc aggagaacc tgcctagaca
 1141 cgtgagtact gtttacacgc caagtgtcg gacactaagg ttgcagccag atgccaaca
 1201 atgggaccag ccactttggc tgaagaacac caggggtgta cagtgtgaa gagagatcag
 1261 agtgatcag gctggggcaa ccactgtgga ctttttggaa agggtagcat tgtggcctgt
 1321 gcaagggcg cttgtgaggc aaaaaagaa gccacaggac atgtgtacga cgccaacaa
 1381 atagtgtaca cggtaaaagt cgaaccacac acgggagact atgttccgc aaacgagaca
 1441 catagtggga ggaagacggc atcctcaca gttctctcag agaaaacat tctgactatg
 1501 ggtgagtatg gagatgtgc tctgtgtgt aggtcgcta gtggcgttga cttggcccag
 1561 accgtatcc ttgacttga caagacagt gaacacctc caacggctt gacgtccac
 1621 agggactggt taaatgatc gctctgcca tggaaacatg agggagcgc aactggaat
 1681 aacgcagaaa gattggttga atttgggct cctcatgctg tcaagatgga tgtgtacaac
 1741 ctggagacc agactggagt gttactgaag gctctcctg gggttcctgt ggcacacatt
 1801 gagggaacca agtaccacct gaagagtggc catgtgacct gcgaagtgg actggaaaaa
 1861 ctgaagatga aaggtcttac gtacacaatg tgtgacaaa caaagttcac atggaagaga
 1921 gctccaacag acagtgggca tgatacagtg gtcatttgc tggacaaaag
 1981 ccctgtagga tcccagtcag ggcagtggca catggatctc cagatgtgaa cgtggccatg
 2041 ctgataacgc caaaccaac aattgaaaac aatggagtg gcttcataga gatgcagctg
 2101 ccccaggag acaacatcat ctatgttggg gaactgagtt atcaatggtt ccaaaaagg
 2161 agtagcatcg gaagagttt ccaaaagacc aagaaggca tagaaagact gacagtgata
 2221 ggggagcacg cctgggactt cggttctgct ggaggcttc tgagtcaat tgggaaggcg
 2281 ttgcacacgg tcttgggtg tctttcaac agcatctcg ggggagtggg gtttctacca
 2341 aagcttctat taggagtggc attggcttg tgggcttga acatgagaaa ccctacaatg
 2401 tccatgactt tctcttggc tggagtctg gttttggcca tgacctgg agtggggcg
 2461 gatgttggct gcgctgtgga cacggaacga atggagctcc gctgtggcga aggcctggtc
 2521 gtgtggagag aggtctcaga atggtatgac aactatgct actaccgga gacaccggg
 2581 gcccttcat cagccataaa ggagacattt gaggaggaa gctgtggcgt agtccccaa

2641 aacaggctcg agatggccat gtggagaagc tcggtcacag agctgaatct ggctctggcg
2701 gaaggtgagg caaatcttac agtgatggg gacaagtttg acccactga ctaccgaggt
2761 ggtgtccctg gtttactgaa aaaaggaaag gacataaaag tctcctggaa aagctggggc
2821 cattcaatga tctggagcat tctgaggcc ccccgctcgt tcatggtggg cacggaagga
2881 caaagtgagt gtccccctga gagacggaag acaggtgttt tcacggtggc agaattcggg
2941 gttggcctga gaacaaaggt ctcttggtat ttcagacagg aaccaacaca tgagtgtgac
3001 acaggagtga tgggagctgc cgtcaagaac ggcatggcaa tccacacaga tcaaagtctc
3061 tggatgagat caatgaaaaa tgacacaggc acttacatag ttgaactttt ggtcactgac
3121 ctgaggaact gctcatggcc tgctagccac actatcgata atgctgacgt ggtggactcg
3181 gagtattcc ttcggcgag ctggcagga cctagatcct ggtacaacag gataccgggt
3241 tattcagaag aggtgaagg gccatggaag cacacgccta tccgagtcag cagagaggag
3301 tgtcccgca cgaccgttac catcaacgcc aagtgtgaca aaagaggagc atctgtgagg
3361 agtaccagag agagtggcaa ggttatccca gaatgggtct gccgagcgtg cacaatgcca
3421 ccagtgacgt tccggactgg aactgattgc tggatgcca tggaaatag gccagtccat
3481 gaccaggggg ggctgtctg ctcaatggtg gttgcggaca acggtgaatt actcagtgag
3541 ggaggggtcc ccggaatagt ggcattgttt gtggtccttg aatacatcat ccgacggaga
3601 ccctccacgg gatcaacggt tgtgtgggga ggcatgctg ttctcgtttt gcttgcacc
3661 gggatggtca ggatggagag cctggtgctg tatgtgtgg cagtggggat cacattccac
3721 cttgagctag ggccagagat cgtggccttg atgctactcc aggctgtgtt tgagctgagg
3781 gtgggtttgc tcagcgcatt tgcgtgctg agaagcctca ccgtccgaga gatggtgacc
3841 acctactttc tttgtctgt cctggaattg gggctgccga gtgcgaacct tgaggattc
3901 tggaaatggg gtgatgact ggccatgggg gcgctgatat tcagggtctg cacggcagaa
3961 gaaagactg gagcggggct cctgctcatg gctctcatga cacagcagga tgtgtgact
4021 gtcatcatg gactggtgtg ctctctgagt gcagctcgg ctgtctgat ctggaggctg
4081 ctcaggggac acagagagca gaagggattg acctggattg tccccctggc tagattgctt
4141 gggggagagg gctctggaat cagactgctg gcgttttggg agctgtcagc tcacagagga
4201 agacgatctt tcagtgaacc actaactgtg gtaggggtca tgctgacatt ggctagcggc
4261 atgatgcgac acacctcca ggaggctctc tgtgactcg cagtggcctc gtttctctg
4321 ttaatgctgg tgctggggac aagaaagatg cagctggttg ccgaatggag tggctgtgtg
4381 gaatggcatc ccgaaactagt gaatgagggg ggagagggta gcctgcgggt ccgtcaggac
4441 gcgatgggaa actttcactt gactgagctc gagaaagaag agagaatgat ggctttttgg
4501 ttgattgccg gcttggcagc ttcggccatt cattggtcag gcattattgg tgtgatggga
4561 ctgtggacgc tcacgaaaat gctgaggtca tcccgaaggt ctgacctggg ttctctgga
4621 caggggggtc gagagcgtgg tgacagacct ttcgagggta aggacggtgt ctacaggatt
4681 ttcagccccg gcttgtctg ggtcagaac caggtgggag ttggctacgg ttccaaaggt
4741 gtcttcaca cgatgtggca tgtgacgaga ggagcggcgc tgtctattga tgatgctgtg
4801 gccgtccct actgggctga tgtgagggag gatgtgtgt gctacggagg agcctggagt
4861 ctggaggaaa aatgaaaagg tgaacagta caggttcatt cctcccacc agggaaggcc
4921 catgaggtgc atcagtcca gcctggggag ttgatccttg acaccggaag gaagcttggg
4981 gcaatacaa ttgatttgg aaaaggaaca tcaggcagcc ccattctta cggccaggga
5041 gtggtcgtgg ggctatacgg aatggccta aagaccaatg agacctacgt cagcagcatt
5101 gctcaagggg aagcggagaa gagtgcacc aacctccac aggctgtgtt gggcacgggc
5161 tggacatcaa agggctagat cacagtgtg gacatgacc caggctcagg gaagaccac
5221 agagtctcc ccgagctcat tcgcaatgc attgacaggc gcctgagaac attggtgtt
5281 gctccaactc gtgtgttact caaagaaatg gagcgcctc tgaatgggaa acgggtcagg
5341 ttccactcac cagcagtcag tgaccaacag gctggagggg caattgtcga tgtgatgtg
5401 cacgcaacct atgtcaacag acggctatta ccacagggga gacaaaattg ggaggtggca
5461 atcatggatg agggccactg gactgacct cacagcatag ctgccagagg tcatttgtac
5521 actctggcaa aagaaaacaa gtgtgactg gtcttgatga cagcgacacc tcctgtaag
5581 agtgaacctt tccggagtc taacggagcc atcactagt aggaaagaca gattccta
5641 ggagagtggc gtgacgggtt tgactggatc actgagtat aaggacgcac agcctggtt
5701 gtccctcga ttgcaaaagg tgggtctata gctcgacct tgagacagaa agggaaaagt
5761 gtgatctgt tgaacagcaa aaccttgaa aaggactact caagagtgag ggatgagaag
5821 cctgactttg tggtagcagc tgatatctg gagatgggag ccaacctga cgtgagccg
5881 gcatagatg ggaggacaaa catcaagcct gaggaggtt atgggaaggt cgagctcacc
5941 gggaccaggc gagtgaccac gcctccgct gcccaacggc gcggaagagt tggcggcaa
6001 gacggacgaa cagatgaata catatactct ggacagtgtg atgatgatga cagtggatta
6061 gtgcaatgga aggaggcga aatacttctt gacaacataa caaccttgcg ggggcccg
6121 gccaccttt atggaccaga acaggacaag atgccggagg tggccggtca ctttcgactc

6181 actgaagaga aaagaaagca cttccgacat cttctcactc attgtgactt tacaccgtgg
6241 ctggcgtggc acgtgcgagc gaatgtgtcc agcgtcacgg atcgaagctg gacatgggaa
6301 gggccggagg caaatgccgt ggaatgagcc agtgggtggct tggcacctt caggagcccc
6361 aatggggcgg agagaactct caggccggtg tgaaggagc cagcatgtt caaagagggg
6421 cgtgacatca aagagttcgt ggcgtacgca tctgggcgtc gcagtttcgg agatgttctg
6481 acaggaatgt cgggagtcc ggagctttg cggcacagat gcgtcagtgc cctggacgtc
6541 ttctacacac tcatgcatga gaaacctgac agcagggcaa tgagaatggc ggagagagac
6601 gccccagagg ctttctgac catggttgag atgatggtg tgggttggc aaccctggg
6661 gtcactggt gcttcgctg cggacttca atcagccgta tgatgctggg cacgctggc
6721 ctgctggcct ctttctact ctttgggca ggtggcgtcg gctatgggaa tatggccgga
6781 gtggccctca tcttctacac gttgctgacg gtgctgcagc cggagggcggg aaaacagaga
6841 agcagtgtga acaacaact ggcataat tttgctgacgc tctgcagcct tgctggactg
6901 gttgaccca atgagatggg ttttctggag aagaccaagg cagactgtc cacggtgctg
6961 tggagtgaac gggaggaacc cggccgtgg agtgaatgga cgaatgtgga catccagcca
7021 cggaggtcct gggggaccta tgtgctggtg gtgtctctgt tcacacctta catcatccac
7081 caactgcaga ccaaatcca acaactgtc aacagtgccg tggcatctgg tgcacaggcc
7141 atgagagacc ttgggggagg tgccccctc tttggtgtg cgggacatgt catgacctc
7201 ggggtggtg cactgattg ggctactccc acctattga tgggtggcgt tggcctggcg
7261 gcactccatc tggccattgt ggtgtctggt ctggaggctg aattgacaca gagagctcat
7321 aaggtctttt tctctgcaat ggtgcgcaac cccatggtg atggggatgt catcaacca
7381 ttcggggagg gggaggcaa acctgctcta tatgaaagga gaatgagtct ggtgctggc
7441 atagtgtgt gcctcatgct ggtggtcatg aaccgaacgg tggcctccat aacagaggct
7501 tcagctgtg gactggcagc agcgggacag ctgctcaggc cggaggctga cacactgtg
7561 acgatgccg ttgctgtg catgagtgt gtggtcagg gtacctgtg ggggttctc
7621 cctctgggc atagactctg gcttcgagct tctggggta ggcgtggtg ttctgagggg
7681 gacacgctg gagatctctg gaaacggagg ctgaacaact gcaccagga ggaattctt
7741 gtgtacaggc gcactggcat cctggagacg gaacgtgaca aggctagaga gttgctcaga
7801 agaggagaga ccaatatggg attggctgtc tctcgggca cggcaaagct tgcctggctc
7861 gaggaacgcg gatatgccac cctcaagga gaggtgtag atcttggatg tgaaggggc
7921 gcctggtcct attatgcggc atcccgaccg gcagtcata gtgtcaggc ataccatt
7981 ggtggaagag gcatgaggc tccaaagatg gtaacaagc tgggttgaa cttgatcaaa
8041 tttgatcag gaatggactg gttcagcatg cagccacacc gggctgacac tgtcatgtg
8101 gacatcggag agagcagccc agatgccct gtggagggg agaggacaag gaaagtata
8161 ttgctatgg agcaatggaa aaacaggaac cccacggctg cctgtgtgtt caaggtgctg
8221 gccccatacc gcccagaagt gatagaagca ctgcacagat tccaactgca atggggggg
8281 ggtctggtga ggaccctt tcaaggaac tccacctatg agatgtatta ctcaacagct
8341 gtcactggga acatagtga ctcgtcaat gtacagtca ggaactttt ggctcggtt
8401 ggagaccaga gaggccaac cagggtgct gaactgacc tgggagttg aacgaggtg
8461 gtggtcttag ctgaggaaa ggtgaaagaa caagatgtac aagagaggat caaagcgtg
8521 cgggagcaat acagcgaac ctggcacatg gacgaggaac atccgtaccg gacatggcag
8581 tattgggca gctaccgac ggcaccaacc ggctcggcgg cgtcactgat caatggggt
8641 gtgaaactc tcagctggcc atggaacgca cgggaagatg tggtcgcat ggccatgact
8701 gacacaacg ctttcggaca gcagagatg tcaaaagata aagttgacac aaaggcacg
8761 gaacctcagc ccggcacaag agtcatcatg agagcagtaa atgattggat tttggaacga
8821 ctggcgcaga aaagcaaacc gcgcatgtc agcagagagg aattcatagc aaaagtgaaa
8881 tcaaacgcag ccttgggagc ttggtcagat gagcaaaaaca gatgggcgag tgcaagagag
8941 gctgtagagg atcctgcatt ctggcacctc gtggatgaag agagagaaag gcacctcatg
9001 gggagatgcg gcactgcgt gtacaacatg atgggcaaga gagagaagaa actgggagag
9061 ttcggagtgg cgaaggaag tggggcatt tggatcatgt ggctggggag tcgcttctg
9121 gaggctgagg ctcttgatt cttgaatgaa gaccattggg cctctagaga gtccagtga
9181 gctggagtg agggaataag cttgaactac ctgggctggc acctcaagaa gttgtcaacc
9241 ctgaatggag gactcttcta tgcatgac acagctggct gggacacgaa agttaccaat
9301 gcagacttag aggatgaaga acagatccta cggatcatg agggtagca caaacaactg
9361 gcaaccacaa taatgcaaaa agcatatcat gccaaagtcg tgaaggtcgc gaggccctcc
9421 cgtgatggag gctgcatcat ggtgtcatc acaagaagag atcaaagagg ttcggccag
9481 gttgtacct atgcccttaa caccctacc aacataaagg tgcaactaat ccgaatgatg
9541 gaaggggag ggtcataga ggcagcggat gcacacaacc cgagactgct tcgagtggag
9601 cgctggctga aagaacatgg agaagagcgt cttggaagaa tgctcgtcag tggtagcatg
9661 tgtgtgtga ggccttga tgacagatt ggcaagcac ttactttct gaatgacatg

9721 gccaagacca ggaaggacat tggggaatgg gagcactcgg ccggcttata aagctgggag
9781 gaagtcccct ttgttcaca ccaattccac gagctagtga tgaaggacgg acgcaccttg
9841 gtggtgccgt gcagagacca agatgaactc gttgggaggg cgcgcatctc accgggatgc
9901 ggctggagtg tccgcgagac ggctgcctt tcaaaagcct acgggcagat gtggctgctg
9961 agctacttcc atcggcgaga cctgaggacg ctcgggcttg ccatcaactc agcagtgcct
10021 gtcgattggg ttctaccgg ccgcacgaca tggagcatcc atgccagtgg ggctggatg
10081 accacagaag acatgctgga cgtctggaac cgggtgtgga tttggacaa cccttcatg
10141 cagaacaagg gaaaggtcat ggagtggagg gatgttccgt acctccctaa agctcaggac
10201 atgttatgtt cctccctcgt tgggaggaaa gaaagagcag aatgggcaa gaacatctgg
10261 ggagcagtgg aaaaggtgag gaagatgata gggcctgaaa agtcaagga ctatctctct
10321 tgtatggacc gccatgacct gcactgggag ctgagactgg agagctcaat aatctaaacc
10381 cagactgtga cagagcaaaa cccggagggc tcgtaaaaga ttgtccgga ccaaaagaaa
10441 agcaagcaac tcacagagtg tgagacccc ctgaccagca aaggggcaga tcggtcaggg
10501 gtgagggatg ccccagagt gcattacggc agcacgccag tgagagtggc gacgggaaaa
10561 tggtcgatcc cgacgtaggg cactctgaaa aactttgtga gaccccctgc atcatgataa
10621 ggccgaacat ggtgcatgaa aaggaggcc cccggaagta cgcttccggg aggagggag
10681 agagaaattg gcagctctct tcaggatit tctcctctct atacaaaatt ccccctcgg
10741 agaggggggg cggttcttgt tctccctgag ccaccatcac ccagacacag atagtctgac
10801 aaggaggtga tgtgtgactc ggaaaaacac ccgt

Podtržení značí změnu nukleotidu Hypr5 oproti variantě Hypr50/V